

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Analyse von Zytokinen im Aszites des Ovarialkarzinoms und
Assoziationen mit der klinischen Progression**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anne-Marie Schwörer

aus Frankfurt am Main

Marburg (Lahn), 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
06.12.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Helmut Schäfer

Referent: PD Dr. rer. physiol. Sabine Müller-Brüsselbach

1. Korreferent: Prof. Dr. med. Uwe Wagner

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	III
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1 SUMMARY.....	1
2 EINLEITUNG.....	4
2.1 Das Ovarialkarzinom.....	4
2.1.1 Epidemiologie	4
2.1.2 Ätiopathogenese und Risikofaktoren	6
2.1.3 Diagnostik.....	10
2.1.3.1 Symptome	10
2.1.3.2 Früherkennung und Screening	10
2.1.3.3 Diagnose	12
2.1.3.4 Rezidivdiagnostik	12
2.1.4 Klassifikation.....	13
2.1.4.1 Staging	13
2.1.4.2 Grading	15
2.1.4.3 Histopathologische Subtypisierung	15
2.1.5 Metastasierung	15
2.1.6 Therapie	16
2.1.6.1 Operation	16
2.1.6.2 Adjuvante Chemotherapie	17
2.1.6.3 Antikörpertherapie.....	17
2.1.6.4 Rezidivtherapie.....	18
2.1.6.5 Therapiemonitoring und Nachsorge.....	18
2.1.7 Prognose.....	19
2.2 Maligner Aszites beim Ovarialkarzinom.....	20
2.2.1 Pathogenese	20
2.2.2 Bedeutung bei der Metastasierung des Ovarialkarzinoms	21
2.2.3 Zytokine im malignen Aszites	22
2.3 Leptin	23
2.4 Zielsetzung.....	25
3 MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 Material.....	27

3.1.1	Geräte.....	27
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	29
3.1.3	Chemikalien	30
3.1.4	Puffer und Lösungen	31
3.1.4.1	Allgemeine Puffer und Lösungen	31
3.1.4.2	Spezielle Puffer und Lösungen	32
3.1.5	Zellkulturmedien und Zusätze	34
3.1.6	Kits	35
3.1.7	Primer	37
3.1.8	Enzyme und Proteinstandards	37
3.1.9	Antikörper	38
3.1.10	Zytokine und Wachstumsfaktoren	39
3.1.11	Auswertungssoftware.....	40
3.2	Methoden.....	41
3.2.1	Biochemische und molekularbiologische Methoden	41
3.2.1.1	RNA-Isolierung aus Zellkulturen	41
3.2.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA.....	42
3.2.1.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	42
3.2.1.4	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR oder Real-Time-PCR)	43
3.2.1.5	Herstellen von Gesamtzell-Proteinextrakten	46
3.2.1.6	Proteinkonzentrationsbestimmung von Gesamtzell-Proteinextrakten	47
3.2.1.7	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	47
3.2.1.8	Western Blot/ Immunblot	49
3.2.1.9	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)	51
3.2.2	Zellbiologische Methoden	52
3.2.2.1	Verwendete Zelllinien.....	52
3.2.2.2	Kultivieren und Passagieren der Zellen	53
3.2.2.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellkulturen	53
3.2.2.4	Zählen von Zellen.....	54
3.2.2.5	In-vitro Angiogenese-Modell mittels „BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix“	54
3.2.2.6	Proliferationsassay mittels des „xCELLigence RTCA DP“ Systems	56
3.2.3	Klinische Probengewinnung	57
3.2.3.1	Patientinnenkollektiv und Probengewinnung	57
3.2.3.2	Datenauswertung	58
4	ERGEBNISSE	59
4.1	Analyse der Zytokine im malignen Aszites bei Ovarialkarzinom.....	59
4.1.1	Quantifizierung ausgewählter Zytokine	59
4.1.2	Korrelation der Zytokinspiegel untereinander	61
4.1.3	Korrelation der Zytokinspiegel mit dem BMI	63
4.1.4	Korrelation der Zytokinspiegel mit dem rezidivfreien Überleben.....	64
4.2	Einfluss von Leptin auf die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen.....	73
4.2.1	Analyse anhand des Zellindex	73
4.2.2	Analyse anhand der Verdopplungszeit.....	76
4.3	Charakterisierung der Signalwege von Leptin in Ovarialkarzinomzelllinien	78

4.3.1	Die Rolle des MAPK-Signalwegs in der Signaltransduktion von Leptin	78
4.3.2	Die Rolle des PI3K/AKT-Signalwegs in der Signaltransduktion von Leptin	80
4.3.3	Die Rolle des STAT3-Signalwegs in der Signaltransduktion von Leptin	81
4.3.3.1	Spezifität des anti-pSTAT3-Antikörpers.....	82
4.3.3.2	Einfluss von Leptin auf die STAT3-Aktivierung in BG1-Zellen.....	83
4.3.3.3	Einfluss von Leptin auf die STAT3-Aktivierung in SKOV3-Zellen.....	84
4.3.3.4	Einfluss von Leptin auf die STAT3-Aktivierung in HUVEC	86
4.4	Etablierung eines Angiogenesemodells („BD Matrigel“)	89
5	DISKUSSION.....	93
5.1	Analyse der Zytokine im malignen Aszites	93
5.1.1	Quantifizierung der Zytokine im malignen Aszites	93
5.1.2	Statistische Auswertung der erhobenen Daten	93
5.2	Der pro-proliferative Effekt von Leptin auf Ovarialkarzinomzellen	97
5.3	Das Angiogenesemodell mit „BD Matrigel“	100
5.4	Die Signaltransduktion in Ovarialkarzinomzellen unter Leptinstimulation.....	102
5.4.1	Aktivierung des MAPK/ERK-Signalweges unter Leptin	102
5.4.2	Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges durch Leptin	102
5.4.3	Die Rolle des STAT3-Signalweges	103
5.5	Ausblick	104
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	106
7	ANHANG.....	113
7.1	Datentabelle.....	113
7.2	Lebenslauf	116
7.3	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	117
7.4	Publikation	118
7.5	Danksagung	119
7.6	Ehrenwörtliche Erklärung	120

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABCA 1	„ATP-binding cassette transporter“
AKT	Protein Kinase B
Bp	Basenpaare
Bzw.	beziehungsweise
CA	„Cancer Antigen“
Ca.	Circa
CI	„Cell Index“ (Zellindex)
cDNA	„complementary DNA“ (komplementäre DNA)
c-Terminus	Carboxyterminus
DNA	„Desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC	Endothelzelle
EGF	„Epithelial growth factor“
ERK	„Extracellular-signal regulated kinase“
et al.	et alii (und andere)
FCS	„Fetal calf serum“ (Fetales Kälberserum)
FGF	„Fibroblast Growth Factor“
GTP	Guanosintriphosphat
h	„hour“ (Stunde)
h	„human“ (menschlich)
HUVEC	„Human umbilical vein endothelial cells“

IGF	“Insulin-like Growth Factor”
IL	Interleukin
IMT	Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (Universität Marburg)
JAK2	Janus Kinase-2
JNK	c-JUN N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LIF	„leukemia inhibitory factor“
m	milli
MAPK	„Mitogen activated protein kinase“
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	“molecular weight” (Molekulargewicht)
N	Nukleotid (A, C, G, T)
nm	Nanometer
n-Terminus	Aminoterminus
OC	Ovarialkarzinom
p	phosphoryliert
PCR	„Polymerase chain reaction“ (Polymerase Kettenreaktion)
PDGF	„Platelet Derived Growth Factor“
pH	Wasserstoffexponent (negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration)

PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B (AKT)
PKC	Proteinkinase C
Q-PCR	Quantitative PCR ("Real-time" PCR)
RFS	„rezidiv free survival“ (rezidivfreies Überleben)
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	„Ribonuclein acid“ (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
STAT3	„Signal transducer and activator of transcription 3“
Tab.	Tabelle
TGF- β	„Transforming growth factor“
TNF α	„Tumor necrosis factor“
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor“
vgl.	vergleiche
w / v	„weight per volume“ (Gewicht / Volumen)
z.B.	zum Beispiel
ZfKR	Zentrum für Krebsregisterdaten
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 2.1 Epidemiologie des Ovarialkarzinoms in Deutschland 1999-2012	4
Abb. 2.2 Verteilung der T-Stadien bei Erstdiagnose Deutschland 2011-2012	11
Abb. 4.1 Streudiagramme der Zytokinspiegel im malignen Aszites.....	60
Abb. 4.2 Korrelation der Leptinkonzentration im Aszites mit dem BMI:	64
Abb. 4.3 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der ANGPTL4-Konzentration.....	65
Abb. 4.4 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der CA 125-Konzentration.	66
Abb. 4.5 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der CCL 2-Konzentration..	66
Abb. 4.6 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der IL 6-Konzentration.	67
Abb. 4.7 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der IL 10-Konzentration. ...	67
Abb. 4.8 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der Leptin-Konzentration.	68
Abb. 4.9 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der ANGPTL4-Konzentration.....	68
Abb. 4.10 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der M-CSF-Konzentration.	69
Abb. 4.11 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der S100 A8-Konzentration.....	69
Abb. 4.12 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der TGF β -Konzentration.	70
Abb. 4.13 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der VEGF A-Konzentration.	70
Abb. 4.14 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der VEGF C-Konzentration.	71
Abb. 4.15 Normalisierter Zellindexverlauf der SKOV3-Zellen unter Leptinstimulation im „xCELLigence RTCA DP“ Experiment	74
Abb. 4.16 Zeitabhängiger Verlauf der Verdopplungszeit der SKOV3-Zellen unbehandelt und unter Leptinstimulation im „xCELLigence RTCA DP“	77
Abb. 4.17 Aktivierung von ERK 1/2 in SKOV3-Zellen unter Leptinstimulation	79
Abb. 4.18 Zeitabhängige Leptin-induzierte AKT-Aktivierung in BG1-Zellen	80
Abb. 4.19 Spezifität des anti-pSTAT3-Antikörpers	82
Abb. 4.20 Leptin- bzw. IL-6-induzierte STAT3-Aktivierung in BG1-Zellen	83
Abb. 4.21 Dosisabhängige STAT3-Aktivierung in SKOV3-Zellen unter Leptinstimulation.....	84
Abb. 4.22 Zeitabhängige STAT3-Aktivierung in SKOV3-Zellen unter Leptinstimulation	85
Abb. 4.23 STAT3-Zielgenexpression in SKOV3-Zellen unter Leptinstimulation.....	86
Abb. 4.24 STAT3-Aktivierung in HUVEC unter Leptinstimulation	87
Abb. 4.25 STAT3-Zielgenexpression in HUVEC unter Leptinstimulation	87
Abb. 4.26 Hemmung der basalen STAT3-Aktivität in HUVEC durch IL-6-Antagonisten	88
Abb. 4.27 HUVEC auf „BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix“ nach 24 Stunden	90
Abb. 4.28 HUVEC auf „BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix“ nach 48 Stunden:	91
Tab. 2.1 TNM- und FIGO-Klassifikation des Ovarialkarzinoms.....	13
Tab. 3.1 Standardprotokoll reverse Transkription.....	43
Tab. 3.2 Temperaturprofil reverse Transkription	43
Tab. 3.3 Standard qPCR-Protokoll	46
Tab. 3.4 Zusammensetzung Lysepuffer zur Proteinextraktion	46

Tab. 3.5: Verwendete Zelllinien	52
Tab. 4.1: Analyse der Werte der Zytokinspiegel [pg/ml] im malignen Aszites	59
Tab. 4.2 r-Werte der Pearson r-Korrelation der Zytokinwerte	61
Tab. 4.3 p-Werte der Pearson r-Korrelation der Zytokinwerte	62
Tab. 4.4 Korrelation der Zytokinspiegel [pg/ml] mit dem BMI [kg/m ²]	63
Tab. 4.5 Medianes rezidivfreies Überleben [Monate] und Hazard Ratio in Abhängigkeit des Zytokinspiegels.....	72
Tab. 4.6 Analyse des Zellindex von SKOV-3 Zellen unbehandelt und unter Leptineinfluss.....	76

1 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist das dritthäufigste gynäkologische Malignom in der westlichen Welt, weist jedoch die höchste Mortalität unter ihnen auf. Als „stummes“ Karzinom wird das Ovarialkarzinom zumeist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Dann liegt meist bereits eine Metastasierung in die gesamte Bauchhöhle mit Ausbildung von Aszites als Folge der Peritonealkarzinose vor. Um einen Anhalt für die Bedeutung einzelner Zytokine bzw. dem Tumormarker CA-125 (im Folgenden unter Zytokine gefasst) im malignen Aszites zu erhalten, wurden deren Konzentrationen in Proben des malignen Aszites von 31 Patientinnen bestimmt und anschließend sowohl untereinander korreliert als auch mit dem rezidivfreien Überleben assoziiert. Signifikante Unterschiede in der rezidivfreien Überlebenszeit der Patientinnen zwischen den als „niedrig“ bzw. „hoch“ gruppierten Zytokinwerten ergaben sich für folgende Zytokine: CA-125 ($***p=0,005$), IL-6 ($*p=0,01$), IL-10 ($****p<0,0001$), LIF ($*p=0,0162$), S100 A8 ($*p=0,0225$) und TGF- β ($*p=0,0378$). In diesen Fällen waren hohe Zytokinspiegel mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben assoziiert. Bei der Berechnung des medianen rezidivfreien Überlebens ergaben sich entsprechend signifikante Unterschiede im Falle von CA-125 (27 vs 13 Monate), IL-6 (27 vs 13,5 Monate), IL-10 (26 vs 12 Monate), LIF (26 vs 13 Monate), S100 A8 (23 vs 12,5 Monate) und TGF- β (27 vs 15 Monate). Auch hier sind hohe Zytokinspiegel mit einem signifikant kürzeren medianen rezidivfreien Überleben assoziiert. Zusätzlich erwiesen sich diese Zytokine als untereinander prädiktiv. Es zeigte sich eine sehr starke Korrelationen zwischen IL-6 und LIF ($r=0,802$; $***p<0,001$), beides STAT3-aktivierende Zytokine. Des Weiteren zeigte sich eine sehr starke Korrelation zwischen M-CSF und CA-125 ($r=0,783$; $***p<0,001$), beide werden sezerniert von Tumorzellen, was einen möglichen Hinweis auf die Tumormasse geben könnte. Dass S100A8 und ANGPTL-4 eventuell beide Zielgene von TGF- β sind, zeigt sich in den starken Korrelationen zwischen S100A8 und TGF- β ($r=0,628$; $***p<0,001$) und ANGPTL-4 und TGF- β ($r=0,593$; $***p<0,001$). Eine moderate Korrelation zeigte sich zwischen IL-6 und IL-10 ($r=0,385$; $*p<0,05$), beides

STAT 3-aktivierende Zytokine. Die Korrelation der Zytokinspiegel mit dem BMI zeigte nur für Leptin signifikante Werte ($r=0,655$; $**p<0,005$). Bei Experimenten mit Ovarialkarzinomzelllinien konnte ein pro-proliferativer Effekt von Leptin beobachtet werden. Die Analyse des vermittelnden Signalweges in verschiedenen Ovarialkarzinomzellen und HUVEC konnte entgegen der Ergebnisse der Literatur keine Aktivierung des Signalweges STAT-3 nachweisen, wohingegen eine verstärkte Induktion des MAPK/ERK-Signalweges und des PI3K/AKT-Signalweges beobachtet werden konnte.

1 Summary

Ovarian cancer is the third most common gynecological cancer in western civilization, but shows the highest mortality among them. Because of its vague symptoms, it is mostly diagnosed at advanced stages. At this stage, metastasis throughout the peritoneal cavity has already taken place and malignant ascites is being produced. In order to get understand the role of some cytokines in malignant ascites, the concentration of certain cytokines and the tumor marker CA-125 (in the following referred to as cytokine) was determined in samples of malignant ascites from 31 ovarian cancer patients. Subsequently, correlations among these results and with respect to associations with the relapse-free survival were measured. Significant differences in relapse-free survival of patients between the two groups "low" and "high" cytokine level were identified for the following cytokines: CA-125 ($***p=0,005$), IL-6 ($*p=0,01$), IL-10 ($****p<0,0001$), LIF ($*p=0,0162$), S100 A8 ($*p=0,0225$) and TGF- β ($*p=0,0378$). In these cases, high cytokine levels were significantly associated with shorter relapse-free survival. Results with respect to median relapse-free survival showed significant differences for CA-125 (27 vs 13 months), IL-6 (27 vs 13,5 months), IL-10 (26 vs 12 months), LIF (26 vs 13 months), S100 A8 (23 vs 12,5 months) und TGF- β (27 vs 15 months). According to above findings, higher

cytokine levels were associated with reduced median relapse-free survival. Additionally, cytokine levels proved to be highly predictive among themselves. We found a strong correlation between IL-6 and LIF ($r=0,802$; $***p<0,001$), both of which are STAT3-activating cytokines. Furthermore there was a strong correlation between M-CSF and CA-125 ($r=0,783$; $***p<0,001$), which are both secreted by tumor cells and might be considered as markers for tumor burden. As target genes of TGF- β , both S100A8 and ANGPTL4 showed a strong correlation with TGF- β level: ($r=0,628$; $***p<0,001$) and ($r=0,593$; $***p<0,001$) respectively. A moderate correlation could be shown for STAT3-activating cytokines IL-6 and IL-10 ($r=0,385$; $*p<0,05$). Correlation of cytokine concentrations and BMI revealed significance only for Leptin ($r=0,655$; $**p<0,005$). The in-vitro experiments with ovarian cancer cell lines indicated a pro-proliferative effect of Leptin. Analysis of the Leptin induced signaling pathways could not confirm literature findings pointing to STAT3 involvement, yet induction of MAPK/ERK-signaling and PI3K/AKT was detectable.

2 Einleitung

2.1 Das Ovarialkarzinom

2.1.1 Epidemiologie

In der westlichen Gesellschaft stellen maligne Tumore nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems die häufigste Todesursache dar. Das Ovarialkarzinom (ICD-10 C56) ist der zehnthäufigste maligne Tumor der Frau (3,3% aller malignen Neubildungen, Stand 2015), stellt jedoch aufgrund seiner hohen Mortalität die fünfthäufigste Todesursache (5,6 % aller Krebssterbefälle) dar. Somit nimmt das Ovarialkarzinom den Platz als tödlichste gynäkologische Malignität ein.

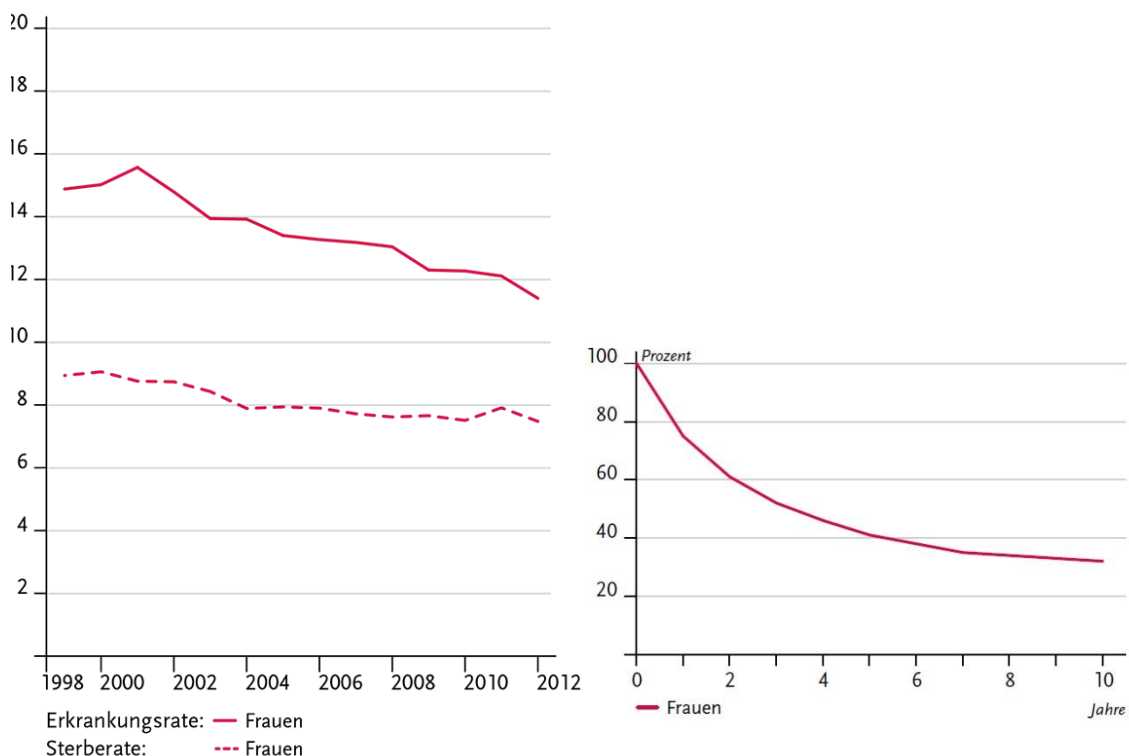


Abb. 2.1 Epidemiologie des Ovarialkarzinoms in Deutschland 1999-2012

links: Alterstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten 1999-2012, je 100.000 Einwohner. **rechts:** relative Überlebensraten bis 10 Jahre nach Erstdiagnose 2011-2012. Datenmaterial des RKI

In Deutschland betrug 2012 die Zahl der Neuerkrankungen 7.380 Frauen (Prognose für 2016: 7200). Im selben Jahr starben 5.646 Frauen infolge eines Ovarialkarzinoms. Die standardisierte Erkrankungsrate betrug 2012 12,2 auf 100.000 Frauen (Prognose für 2016: 10,7 auf 100.000 Frauen). Die standardisierte Sterberate betrug 7,5 auf 100.000 Frauen. Sowohl die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten, als auch die absoluten Zahlen gehen seit 2001 zurück. Als mögliche Ursachen für den Rückgang der absoluten Fallzahlen werden bessere Bedingungen für eine frühe Diagnosestellung diskutiert, als Ursache für den Rückgang der altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten wird die insgesamt abnehmende Mortalität in der Altersgruppe der unter 65-Jährigen angenommen.

Das Lebenszeitrisko einer Erkrankung beträgt knapp 1,4 %. Es erkrankt also eine von 72 Frauen im Laufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinom und eine von 91 Frauen verstirbt im Laufe ihres Lebens daran. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren, wobei die Erkrankungsraten bis zum 85. Lebensjahr ansteigen.

Die relative 5-Jahres- Überlebensrate ist in den letzten Jahrzehnten kaum gestiegen (1980: 34 %) und beträgt derzeit ungefähr 41 %. Damit ist die Mortalität im Vergleich zu den beiden häufigeren gynäkologischen Krebsentitäten (Endometrium- und Zervixkarzinom) nach wie vor deutlich höher. Obwohl die Mortalität deutschlandweit in etwa gleich verteilt ist, liegt die Inzidenz in dem Bundesland Hamburg deutlich über dem deutschen Mittel (knapp 15 auf 100.000). Im internationalen Vergleich liegt Deutschland im Mittelfeld, wobei Großbritannien, Tschechien, Dänemark und Polen deutlich höhere Inzidenzen aufweisen (15 bis 18 pro 100.000). Die 5-Jahres Überlebensrate ist dabei stark vom Zeitpunkt der Diagnose abhängig. Der Hauptgrund für die hohe Mortalität liegt daher in der meist späten Diagnosestellung, wenn die Erkrankung bereits in einem fortgeschrittenen Stadium ist (Datenquelle: „Krebs in Deutschland 2015“ des Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert-Koch-Institut).

2.1.2 Ätiopathogenese und Risikofaktoren

Ätiopathogenese

Über die Pathogenese des Ovarialkarzinoms sind in den letzten Jahren viele Erkenntnisse gewonnen worden, dennoch verbleibt ein Großteil des Pathomechanismus ungeklärt. Es setzt sich zunehmend die Erkenntnis durch, dass die verschiedenen histologischen Subtypen auf unterschiedliche Pathogenesen zurückzuführen sind. Um eine zielgerichtete Therapie gewährleisten zu können, ist es daher notwendig die molekularen Zusammenhänge der einzelnen Subtypen so genau wie möglich zu charakterisieren.

Aus der Beobachtung der Risikofaktoren (s.u.) in Zusammenschau mit der Pathogenese des Ovarialkarzinoms wurde die Theorie abgeleitet, dass das Risiko einer malignen Entartung des ovarialen Epithels mit der Anzahl an Ovulationen steigt. Bei jeder Ovulation entsteht durch Ruptur des Epithels ein umschriebener Defekt, auf den das funktionale Gewebe mit Proliferation und Umorganisation reagiert. Diese Prozesse begünstigen die Entartung („incessant ovulation“-Theorie) (Terry et al., 2007).

Die Ergebnisse vieler Studien weisen darauf hin, dass Hormone, die die Reproduktivität und das Wachstum steuern, eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese spielen. Antagonisten des Gonadotropin-Releasing-Hormons konnten in-vitro und im Mausmodell das Tumorstadium inhibieren (Papadia et al., 2011).

90 % der Ovarialkarzinome gehen vom Epithel aus. 5-10 % der Ovarialkarzinome entstammen nicht primär dem Ovarialepithel, sondern sind Metastasen anderer Malignome, die dann am häufigsten im Verdauungstrakt lokalisiert sind. Eine genetische Prädisposition findet sich bei ca. 5 % der Patientinnen (*siehe Risikofaktoren*).

Dem hochgradigen serösen und dem endometrioiden Karzinom liegen häufig chromosomale Instabilitäten zugrunde, die mit einem funktionellen Verlust von BRCA-1/2 und TP53 einhergehen. Das niedriggradige seröse Karzinom ist dagegen häufig charakterisiert durch Punktmutationen in KRAS oder BRAF, was zu einer starken Aktivierung des RAS-RAF Signalweges führt. Auch beim endometrioiden Karzinom können auf molekularer Ebene Unterschiede zwischen der niedrig- und hochgradigen Ausprägung ausgemacht werden. Das niedriggradige endometrioide Karzinom geht häufig mit Mutationen von beta-Catenin und PTEN einher. Das hochgradige endometrioide Karzinom weist ähnliche Veränderungen wie das hochgradige seröse Karzinom auf. Muzinöse Karzinome sind häufig mit KRAS Mutationen assoziiert. Das klarzellige Karzinom ist charakterisiert durch Mutationen des TGF-beta-Rezeptor-2 und einer Überexpression von HNF-1beta.

Es wird diskutiert, ob einige Karzinome direkt „de-novo“ aus dem ovariellen Epithel entstehen (hochgradiges endometrioides Karzinom), während sich andere Karzinome aus Vorstufen (Muzinöses und niedriggradiges seröses Karzinom) oder auf dem Boden einer Endometriose entwickeln (niedriggradiges endometrioides Karzinom, klarzelliges Karzinom) (Diebold, 2005; Christie et al., 2006).

Risikofaktoren

Das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken steigt generell mit zunehmendem Alter. Es sind zudem eine Reihe weiterer Faktoren bekannt, die signifikant mit dem Auftreten eines Ovarialkarzinoms assoziiert sind.

Insbesondere der Zusammenhang mit Hormonen, die der Steuerung der reproduktiven Funktionen dienen, gilt als gesichert. Hormonersatzbehandlungen in der Peri- und Postmenopause steigern das relative Risiko einer Erkrankung um 38%. Zwischen den einzelnen Präparaten konnte kein Unterschied festgestellt werden und auch die Dauer der Einnahme zeigte keinen signifikanten Unterschied. Zwei bis vier Jahre nach Absetzen der

Therapie lässt sich keine Risikosteigerung mehr nachweisen (Mørch et al., 2009). Eine weitere Studie (Beral et al., 2007) beschrieb eine Risikosteigerung insbesondere beim serösen Ovarialkarzinom. Hier wurde auch eine Zunahme des Risikos abhängig von der Dauer der Einnahme beobachtet. Ein Zusammenhang mit der Behandlung mit fertilitätssteigernden Medikamenten wie Ovulationsinduktoren ist noch nicht abschließend geklärt (Kurta et al., 2012). Infertilität steigert das relative Risiko um 35 % (Tworoger et al., 2007). Es wird diskutiert, dass das Polycystische Ovarialsyndrom ebenfalls mit einer Steigerung des Risikos einhergeht (Dumesic et al., 2013).

In 10 % der Fälle kann eine genetische Prädispositionen nachgewiesen werden (Borges et al., 2011). Mutationen in den Genen BRCA1 auf Chromosom 17q und BRCA2 auf Chromosom 13q sind hauptverantwortlich für das familiäre Brust- und Eierstockkrebssyndrom. Patientinnen mit einer BRCA1-Genmutation haben ein Lebenszeitrisiko von 36 - 46%, Patientinnen mit einer BRCA2-Genmutation ein Risiko von 10 – 27 %. Bei gesichertem Vorliegen der Mutation und abgeschlossener Familienplanung wird zu einer prophylaktischen Entfernung beider Ovarien und Tuben geraten (Timothy et al., 2009). Mutationen in den Mismatch-Repair-Genen (MLH1, MSH2, MLH3, MSH6, PMS2) sind für die Ausprägung des Lynch-Syndroms verantwortlich, einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung, die mit diversen frühzeitig auftretenden Karzinomen einhergeht. Am häufigsten ist hier das Colon betroffen, aber auch das Ovar entartet gehäuft. Häufigster histologischer Subtyp ist dabei das seröse Adenokarzinom. Die Prognose ist besser als die des sporadisch auftretenden Ovarialkarzinoms (Ma et al., 2012). Beim hereditären Ovarialkarzinom-Syndrom ist ausschließlich das Ovar betroffen.

Der wichtigste Risikofaktor, der den Lebensstil betrifft ist der Body-Mass-Index. In mehreren großen prospektiven Studien wurde bei Betrachtung aller Frauen eine Erhöhung des relativen Risikos um 16% bei übergewichtigen (BMI 25 – 29,9 kg / m²) und um 26 % bei adipösen (BMI \geq 30 kg / m²) gegenüber normalgewichtigen Frauen (BMI von 18,5 – 24,9 kg / m²) beobachtet.

Interessant ist dabei die Abhängigkeit der Risikoerhöhung durch hohen BMI von dem sonst vorliegenden Risikoprofil der Frauen. Adipöse Frauen, die niemals eine Hormonersatzbehandlung erhalten haben, hatten ein um 83 % erhöhtes relatives Risiko ein Ovarialkarzinom zu entwickeln. Übergewichtige Frauen hingegen, die zusätzlich jemals einer Hormonersatzbehandlung unterzogen worden waren hatten kein zusätzlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms. Normalgewichtige Frauen, in deren Familie ein Ovarialkarzinom aufgetreten ist, hatten ein um 36 % erhöhtes relatives Risiko, wohingegen bei übergewichtigen Frauen durch diesen Risikofaktor keine weitere Risikoerhöhung festzustellen war (Leitzmann et al., 2009; Rodriguez et al., 2002).

Viele Studien konnten eine unterschiedlich starke Korrelation einiger Risikofaktoren mit dem Auftreten von Ovarialkarzinom unter den einzelnen Subtypen ausmachen. Insbesondere der reproduktive Status wirkte sich unterschiedlich auf das relative Risiko einer malignen Entartung aus. Die Odds Ratios von pluriparen Frauen gegenüber nulliparen Frauen betrugen 0,6 für das seröse, 0,4 für das endometrioides, 1,0 für das muzinöse und 0,7 für sonstige histologische Typen (Chiaffarino et al., 2007). Dies unterstützt die Auffassung, dass die histologischen Subtypen unterschiedliche Pathogenesen aufweisen.

Es wurden darüber hinaus Faktoren identifiziert, die einen protektiven Einfluss auf das Ovarialkarzinom haben. Die Einnahme von Ovulationshemmern reduziert das relative Risiko um 50%, unabhängig von dem histologischen Subtyp des Ovarialkarzinoms. Diese Risikoreduktion zeigt sich insbesondere auch bei BRCA-1/2 Mutationsträgerinnen. Der schützende Effekt wird umso stärker, je länger das Präparat eingenommen wurde und hält bis zu 28 Jahre und mehr nach Absetzen an. Von dieser Risikoreduktion ausgenommen ist das muzinöse Karzinom (Vessey et al., 2013; Antoniou et al., 2009). Auch die Tubenligatur verringert das relative Risiko der Entstehung eines Ovarialkarzinoms um 34%. Ausgenommen ist hier wieder das muzinöse Karzinom. Auf diesem Zusammenhang beruht die Theorie, dass ein retrograder Transport von Endometriumzellen eine Rolle spielen könnte (Cibula et al.,

2011). Pluriparität sowie längere Laktationsphasen haben ebenso einen schützenden Einfluss auf die Entstehung eines Ovarialkarzinoms (Riman et al., 1998).

2.1.3 Diagnostik

2.1.3.1 Symptome

Das Ovarialkarzinom stellt sich in den Frühstadien (FIGO I und II) symptomarm dar und den Spätstadien (FIGO III und IV) geht eine lange symptomarme Phase voraus. Deswegen wird das Ovarialkarzinom häufig als „stille Erkrankung“ bezeichnet. In den letzten Jahren konnten Studien jedoch zunehmend zeigen, dass bei einem Großteil der Patientinnen unspezifische Symptome vorliegen, die bei der Diagnose eines Ovarialkarzinoms hilfreich sein können.

Eine Fall-Kontroll-Studie von Goff et al. konnte 2007 zeigen, dass die Symptome abdominaler/pelviner Schmerz, erhöhte Miktionsfrequenz, aufgeblähtes Abdomen/Zunahme des abdominalen Umfangs und verfrühtes Völlegefühl bei der Nahrungsaufnahme signifikant mit dem Vorliegen eines Ovarialkarzinoms assoziiert sind, wenn sie seit weniger als einem Jahr mit einer Häufigkeit von mehr als 12 Tagen im Monat vorliegen (Goff et al., 2007).

2.1.3.2 Früherkennung und Screening

Die wichtigsten Prognosefaktoren für das klinische Ergebnis von Patientinnen mit Ovarialkarzinom sind die Vollständigkeit der radikalen Entfernung des Tumors und damit zusammenhängend das Stadium bei Diagnosestellung bzw. der Differenzierungsgrad (Winter et al., 2007).

Knapp 75% der Ovarialkarzinome befinden sich bei Diagnosestellung bereits in den Stadien T2 und T3 und breiten sich definitionsgemäß bereits im kleinen Becken oder darüber hinaus aus (ZfKR, RKI: „Krebs in Deutschland 2015“, s. Abb. 2.2). Mit zunehmender Ausbreitung wird es schwieriger den Tumor operativ restlos zu resektieren.

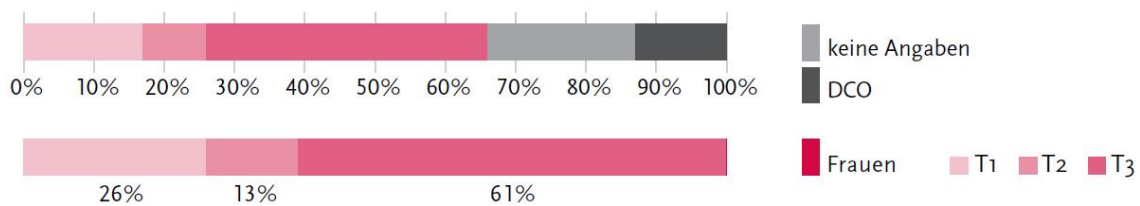


Abb. 2.2 Verteilung der T-Stadien bei Erstdiagnose Deutschland 2011-2012 (ZfKR, RKI: „Krebs in Deutschland 2015“)

Um das rezidivfreie Überleben und damit das Gesamtüberleben beim Ovarialkarzinom zu verlängern, ist neben der Entwicklung von standardisierten radikalen Operationstechniken mit kombinierter Paclitaxel/Platinum Chemotherapie auch eine Möglichkeit zur früheren Erkennung und Behandlung notwendig.

In einer randomisiert-kontrollierten Studie (Buys et al., 2011) konnte durch ein Screening, bestehend aus der Bestimmung von CA-125 (Tumorantigen) und transvaginalen Ultraschall, keine Senkung der Mortalität gegenüber der Kontrollgruppe mit Standardvorsorge erzielt werden. Zusätzlich war die operative Exploration falsch-positiver Patientinnen mit teils schweren Komplikationen assoziiert.

Aufgrund der Datenlage kann ein Screening laut S3-Leitlinie in Deutschland nicht empfohlen werden (Leitlinienprogramm Onkologie, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2013).

2.1.3.3 Diagnose

Bei Verdacht auf eine ovarielle Raumforderung aufgrund oben genannter Symptomdarstellung sollte laut S3-Leitlinie zunächst eine gynäkologische Untersuchung, bestehend aus Tast- und Spiegeluntersuchung, sowie eine transvaginale Sonographie durchgeführt werden. Dies gilt insbesondere für Frauen über 50 Jahre.

Das apparative Staging erfolgt mittels hochauflösender bildgebender Verfahren wie CT und MRT, da die transvaginale Sonographie nicht das komplette Becken darstellen kann. Die transvaginale Sonographie hat jedoch zur Abklärung der Dignität des Befundes den höchsten Stellenwert. Der Grad der Operabilität ist jedoch durch apparative Diagnostik nicht verlässlich einschätzbar, da peritoneale und mesenteriale Tumorabscheidungen nur unzureichend beurteilt werden können. Ein operatives Staging ist deswegen immer indiziert. Dabei muss die komplette Bauchhöhle bis zum Zwerchfell exploriert werden und insbesondere auf auffällige Befunde am Peritoneum geachtet werden. Die diagnostische Punktion eines zystischen Tumors ist streng kontraindiziert, da die Gefahr besteht die Tumorkapsel zu verletzen und eine Aussaat von Tumorzellen in die Peritonealhöhle zu induzieren (Leitlinienprogramm Onkologie 2013, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF).

2.1.3.4 Rezidivdiagnostik

Dem Auftreten von klinischen Zeichen eines Rezidivs geht häufig einige Monate zuvor ein Anstieg des Tumormarkers CA-125 voraus.

Bei asymptomatischen Patientinnen mit erhöhtem CA-125 Wert konnte keine Verbesserung des Langzeitüberlebens mittels präsymptomatischer Rezidivbehandlung im Vergleich zur Behandlung nach dem Auftreten von klinischen Zeichen beobachtet werden. Die Aussagekraft der Routinebestimmung von CA-125 in der Nachbeobachtungsphase von

Patientinnen, die unter Erstbehandlung tumorfrei wurden, kann damit nicht bestätigt werden (Rustin et al., 2010).

Bei symptomatischen Patientinnen ist der Einsatz von bildgebender Diagnostik gerechtfertigt. Verfahren der Wahl ist das CT oder PET-CT (Forstner et al., 2010).

2.1.4 Klassifikation

Das Ovarialkarzinom bildet eine heterogene Gruppe verschiedener histologischer Tumorentitäten. Da sich die verschiedenen Subtypen in ihrem tumorbiologischen Verhalten und ihrer Prognose unterscheiden, ist die präzise Klassifikation von großer Bedeutung.

2.1.4.1 Staging

Das Staging des Ovarialkarzinoms erfolgt gemäß aktueller TNM-Klassifikation der WHO, die der FIGO-Klassifikation (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) weitgehend entspricht (s. *Tab. 2.1*).

TNM	FIGO	Kriterien
T1	I	Tumor begrenzt auf Ovarien
T1a	IA	Tumor begrenzt auf ein Ovar, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars, keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
T1b	IB	Tumor begrenzt auf beide Ovary, Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche der Ovary, keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
T1c	IC	Tumor auf ein oder beide Ovary begrenzt, Kapsel durchbrochen, Tumor auf der Ovaroberfläche oder maligne

		Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
T2	II	Tumorausbreitung im Becken
T2a	IIA	Tumorausbreitung und/oder Implantate in Uterus und/oder Tuben, keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
T2b	IIB	Tumorausbreitung auf andere Beckengewebe, keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
T2c	IIC	2a oder 2b, zusätzlich maligne Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
T3	III	Histologisch gesicherte Tumorausbreitung über das Becken hinaus und/oder regionäre Lymphknotenmetastase
T3a	IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen ausserhalb des Beckens
T3b	IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens, maximale Ausdehnung bis 2 cm
T3c	IIIC	Makroskopische Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens, maximale Ausdehnung über 2 cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
Nx		Regionäre Lymphknoten sind nicht beurteilbar
NO		Keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachweisbar
N1		Regionale Lymphknotenmetastasen nachweisbar
MO		Keine Fernmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen (ausgenommen Peritonealmetastasen)

Tab. 2.1 TNM- und FIGO-Klassifikation des Ovarialkarzinoms (UICC, Genf, Schweiz; FIGO, London, UK)

2.1.4.2 Grading

Das histopathologische Grading erfolgt nach einem dreistufigen Prinzip gemäß WHO oder FIGO. Dabei wird unterschieden zwischen G1 (hoch differenziert), G2 (mäßig differenziert) und G3 (gering differenziert).

2.1.4.3 Histopathologische Subtypisierung

Die primären Karzinome des Ovars gehen zu 90 % vom Oberflächenepithel aus (Christie et al., 2006). Die häufigsten histologischen Subtypen sind dabei das seröse (50 %), das endometriode (20 %), muzinöse (10 %) und das klarzellige Ovarialkarzinom (5%), gefolgt von eher seltenen Typen wie dem malignen Brenner-Tumor, und dem undifferenzierten Karzinom. Davon abzugrenzen sind Karzinome anderer histologischer Gewebetypen, wie die Keimzelltumore, Keimstrang-Stroma-Tumore und Granulosazelltumore.

Bei dem serösen und endometrioiden Ovarialkarzinom kann nochmal zwischen niedriggradig und hochgradig unterschieden werden. Den beiden Typen liegen jeweils unterschiedliche Pathogenesen zugrunde und sie verhalten sich deswegen eher wie verschiedene Subtypen (McCluggage, 2011).

2.1.5 Metastasierung

Eine ausgedehnte Metastasierung in die Peritonealhöhle ist typisch für das fortgeschrittene Ovarialkarzinom. Die Dissemination erfolgt hauptsächlich lymphogen entlang der ovariellen Gefäßstrukturen in die paraaortalen und über die Parametrien in die pelvinen Lymphknotenstationen. Eine Metaanalyse kam zu dem Ergebnis, dass im Stadium I und II des epithelialen Ovarialkarzinoms 14,2 % der Patientinnen einen nodalen Befall aufwiesen (7,1 % in der paraaortalen, 2,9 % in der pelvinen und 4,3 % in beiden Regionen) (Kleppe et

al., 2011). Eine hämatogene Metastasierung kommt nur selten vor, betroffen sind dann meist Lunge und Leber. Der Aszites beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom dient als Trägermedium für Tumorzellen und stellt einen bedeutenden Faktor in der Tumorausbreitung dar (Smolle et al., 2014).

2.1.6 Therapie

Die Behandlung erfolgt stadiengemäß mit einer primären radikalen Operation und einer adjuvanten Chemotherapie.

2.1.6.1 Operation

Die primäre Operation verfolgt neben dem vollständigen Staging das Ziel einer maximalen Tumorresektion. Dabei müssen der Primärtumor und alle während der Längslaparotomie makroskopisch sichtbaren und palpablen Tumorabscheidungen entfernt werden. Auffällige Befunde unklarer Dignität müssen bioptisch gesichert werden. Die systematische Lymphonodektomie ist ein essentieller Bestandteil des Staging, da bis zu 25 % der Patienten, die zuvor fälschlicherweise als Stadium T1 eingestuft wurden, in der Analyse der Lymphknoten einen nodalen Befall aufweisen. Die Größe des Resttumors ist der einzige beeinflussbare Prognosefaktor. Sofern der Tumor auf das kleine Becken beschränkt ist (Stadien FIGO I bis IIA) beinhaltet der Goldstandard beim Operationsvorgehen die bilaterale Entfernung der Adnexe, die Hysterektomie, eine kaudale Omektomie und beim muzinösen Ovarialkarzinom eine Appendektomie. Nur bei gesichertem Stadium IA, G1 ist ein fertilitätserhaltendes Vorgehen möglich. Beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (Stadium FIGO IIB und höher) müssen alle befallenen Organanteile und Gewebe entfernt werden, dazu gehören oft auch Darmanteile. Eine makroskopisch komplette Tumorresektion verlängert signifikant das

Gesamtüberleben (im Stadium IIB bis IIIB um 60, im Stadium IIIC um 47 und im Stadium IV um 30 Monate) (Du Bois et al., 2009).

2.1.6.2 Adjuvante Chemotherapie

Um etwaig nicht resezierte Tumorzellen zu vernichten, ist bei den Tumorstadien FIGO I bis IIA außer FIGO IA, G1 im Anschluss an die Operation eine platinhaltige Chemotherapie über mindestens 6 Zyklen angezeigt. Standardtherapie ist derzeit die Kombination aus Carboplatin mit Paclitaxel, wobei frühe Stadien auch ausschließlich mit einer Monotherapie Carboplatin behandelt werden können. Dadurch verbessert sich sowohl das 5-Jahres-Überleben (Steigerung von 78 % auf 85 %), als auch das progressionsfreie 5-Jahres-Überleben (Steigerung von 68 % auf 76 %) (Trimbos et al., 2002). Fortgeschrittene Tumore sollten immer mit einer Kombinationstherapie Carboplatin/Paclitaxel über 6 Zyklen nachbehandelt werden (du Bois et al., 2003).

Derzeit kann noch keine Empfehlung für eine unterschiedliche Behandlung der histologischen und molekularen Subtypen ausgesprochen werden.

2.1.6.3 Antikörpertherapie

Beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom der Stadien IIIB bis IV kann zusätzlich zur Chemotherapie eine Antikörpertherapie mit Bevacizumab, einem VEGF-Inhibitor, durchgeführt werden, die darüber hinaus als Erhaltungstherapie über 12 Zyklen weitergeführt wird. Dadurch wurde eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens beobachtet, von dem insbesondere die Patienten mit hohem Risiko für einen Progress profitierten (Perren et al., 2011).

2.1.6.4 Rezidivtherapie

Beim platinresistenten Ovarialkarzinom (Rezidiv innerhalb von 6 Monaten nach Beendigung der Chemotherapie) wird eine Monochemotherapie mit einem nicht platinhaltigen Zytostatikum (unter anderem pegyliertes liposomales Doxorubicin, Gemcitabin, Topotecan und Paclitaxel) empfohlen. Hauptziel in dieser Situation ist die Symptomkontrolle und Optimierung der Lebensqualität der Patientin.

Patientinnen mit platinsensiblen (Rezidiv frühestens nach 12 Monaten nach Beendigung der Chemotherapie) und einem partiell platinsensiblen Ovarialkarzinom (Rezidiv innerhalb von 6 bis 12 Monaten nach Beendigung der Chemotherapie) sollten eine Kombinationschemotherapie mit einem platinhaltigen Zytostatikum erhalten. Auch hier kann eine Ergänzung mit dem Antikörper Bevacizumab eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens erzielen (Aghajanian et al., 2012). Angestrebtes Ziel ist die Verlängerung des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens.

Zum Nutzen einer erneuten Operation bei Rezidiv kann aufgrund der mangelnden Datenlage keine endgültige Aussage getroffen werden. Patientinnen, die ein platinsensibles Ovarialkarzinom aufweisen und aufgrund guter Allgemeinbedingungen eine komplette Tumoresektion erwarten lassen, können von einer erneuten Operation profitieren (Al Rahawi et al., 2013).

2.1.6.5 Therapiemonitoring und Nachsorge

Das Therapiemonitoring zur Beurteilung des Ansprechens auf die Chemotherapie erfolgt vorzugsweise mittels klinischer Untersuchung. Hilfreich können aber auch die Sonographie oder Schnittbildverfahren (CT oder MRT) sein. Der Tumormarker CA-125 kann begleitend als Verlaufsparemeter erhoben werden, sofern er vor Beginn der Therapie erhöht war.

Die Nachsorge hat insbesondere die frühere Erkennung eines Rezidivs zum Ziel. Hier führt die Erhebung des Tumormarkers CA-125 nicht zu einem besseren Überleben (Rustin et al., 2010). Auch die apparative Routineuntersuchung bei symptomfreien Patientinnen verlängert nicht das Gesamtüberleben und sollte daher nicht durchgeführt werden. Die Nachsorge sollte sich auf die körperliche, rektale und gynäkologische Untersuchung inklusive Vaginalsonographie stützen.

Ein weiterer Bestandteil der Nachsorge sollte das Angebot einer psychoonkologischen Beratung und Unterstützung sein, sowohl für die Patientinnen als auch für deren Angehörige. In jedem Fall sollte regelmäßig die Lebensqualität mittels ärztlichem Gespräch oder standardisierten Fragebögen evaluiert werden.

2.1.7 Prognose

Es sind mehrere Faktoren etabliert worden, die sich signifikant und unabhängig auf die Prognose auswirken. Betrachtet werden dabei Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben.

Tumorstadium bei Diagnosestellung und Größe des Resttumors nach Primäroperation haben den höchsten prädiktiven Wert. Beim frühen Ovarialkarzinom kommt der Qualität des Staging eine große Bedeutung zu, da hiervon die anschließende Empfehlung zum Verzicht auf eine adjuvante Chemotherapie bei FIGO IA, G1 abhängt (Du Bois et al., 2009).

Alter und Allgemeinzustand (ECOG-Status) sind ebenfalls als Prognosefaktoren identifiziert worden. Hier spielen vermutlich altersphysiologische und therapieassoziierte Nebenwirkungen, sowie Komorbiditäten eine prognostische Relevanz.

Unter den tumorbiologischen Parametern spielen bisher nur der histologische Subtyp und das Grading eine Rolle in der Prognose. Das muzinöse und klarzellige Karzinom ist mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert als das seröse und endometrioides Karzinom, was sich aus der erhöhten Resistenz gegenüber platinhaltiger Kombinationschemotherapie begründet (Winter et al., 2007).

Die genannten Daten in Abschnitt 2.1 wurden den aktuellen Empfehlungen der AGO-Ovar, 2013 entnommen.

2.2 Maligner Aszites beim Ovarialkarzinom

2.2.1 Pathogenese

Der Begriff Aszites bezeichnet die Entstehung eines Ergusses in der Peritonealhöhle aufgrund verschiedener Ursachen. Es gilt den sekundär durch andere Erkrankungen (v.a. Infektionen, Leberschäden, Malnutrition, Lungenembolien, Grunderkrankungen des rheumatischen Formenkreises und therapieassoziierte Organschäden) verursachten Aszites vom tumorassoziierten Aszites abzugrenzen. Jeder zehnte Aszites kann auf eine maligne Erkrankung zurückgeführt werden, die zumeist von einem Organ des Verdauungstraktes oder den Ovarien (25 %) ausgeht.

Beim Ovarialkarzinom weist das Vorhandensein von Tumorzellen im Aszites auf ein fortgeschrittenes Stadium hin (definitionsgemäß Stadium FIGO IIC). Hier ist der Aszites zumeist Ausdruck einer Peritonealkarzinose. Zum einen ist durch die Auflagerung von tumorösem Gewebe der Abfluss des peritonealen Lymphsystems gestört, zum Anderen setzen die Tumorzellen VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) frei, was zu einer vermehrten Gefäßbildung mit hoch permeablen Endothelien führt. Diese beiden Faktoren führen zu einem erhöhten

Übertritt von Flüssigkeit aus den Kapillaren des Peritoneums in die Bauchhöhle. Eine Linderung der Symptome wie Dyspnoe, Reflux, Übelkeit und Schmerzen kann durch wiederholte Parazentese geschaffen werden. Dies muss aber meist nach ca. 10 Tagen wiederholt werden, was sowohl eine hohe Belastung als auch ein Infektionsrisiko darstellt. Als primär symptomatische Therapie des Aszites wird inzwischen die Anwendung von diversen VEGF-Inhibitoren genutzt. Der intraperitoneal applizierte monoklonale Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab bewirkte als Addition zur Chemotherapie in mehreren Studien eine Abnahme der Aszitesproduktion und daraus resultierend eine verlängerte Zeit zwischen zwei Parazentesen (u.a. Smolle et al., 2014). Aflibercept ist ein neueres Fusionsprotein aus einem Fragment des VEGF-Rezeptors mit einem humanen Antikörper und hat damit den gleichen Wirkmechanismus wie Bevacizumab. In Phase-II-Studien wurde eine Verlängerung des Intervalls zwischen zwei nötigen Parazentesen unter Therapie im Vergleich mit Placebo registriert: von 23,3 auf 55,1 Tage (Gotlieb et al., 2011) bzw. von 16,8 auf 76,0 Tagen (Colombo et al. 2012). Seit 2009 ist der trifunktionale monoklonale Antikörper Catumaxumab zugelassen, der zu den Immunmodulatoren gehört. Er bindet spezifisch sowohl an EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), das auf vielen Tumorzellen epithelialen Ursprungs exprimiert wird, als auch an CD3+ T-Zellen und unspezifisch über den Fc-Teil an akzessorische Zellen. Dadurch soll die intraperitoneale Tumorlast gesenkt werden. In Studien zeigte sich ein Rückgang der Aszitesproduktion (Smolle et al., 2014). Kausale Behandlungsmöglichkeiten ergeben sich aus der stadiengerechten Standardtherapie des Ovarialkarzinoms. Diese sind beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom jedoch bislang spärlich (*siehe Therapie Ovarialkarzinom*).

2.2.2 Bedeutung bei der Metastasierung des Ovarialkarzinoms

Der Aszites spielt bei der Metastasierung des Ovarialkarzinoms eine entscheidende Rolle, da er einen konstanten Träger für Tumorzellen darstellt.

Bisherige Analysen der Zusammensetzung haben ergeben, dass eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen im Aszites ein optimales Medium für die Tumorzellen bilden. Es ist bekannt, dass das Tumorumfeld einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation und Migration der Tumorzellen, sowie die Angiogenese hat. Es wurde nachgewiesen, dass Aszites einen schützenden Effekt auf das Überleben von Tumorzellen hat, indem Anti-Apoptose Signalwege wie PI3K/AKT aktiviert werden (Lane et al., 2010). Die durch den Aszites geschaffene Tumorumgebung, führt so möglicherweise zur Resistenzbildung gegenüber Chemotherapien und begünstigt das Auftreten von Rezidiven.

2.2.3 Zytokine im malignen Aszites

Zytokine sind vom Körper produzierte niedermolekulare Polypeptide, die regulatorische Funktionen in der Zelldifferenzierung und Immunmodulation übernehmen. Sie werden hauptsächlich von den Zellen der unspezifischen (Makrophagen, natürliche Killerzellen) und spezifischen (B-Lymphozyten, T-Lymphozyten) Immunabwehr sezerniert. Sie wirken parakrin, autokrin als auch endokrin über membranständige Rezeptoren, die in 7 Klassen eingeteilt werden. Ihr Effekt ist pleiotrop, d.h. sie können in verschiedenen Zielzellen unterschiedliche Effekte auslösen. Dabei überschneiden sich die Wirkungen der einzelnen Zytokine untereinander, was als Redundanz der Zytokinwirkung bezeichnet wird. Zu den immunmodulierenden Zytokinen werden die Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF), Interferone (IF), der „Transforming growth factor- β “ (TGF- β), Chemokine und die koloniestimulierenden Faktoren (CSF) gezählt.

In den letzten Jahren wurde darüber hinaus zunehmend über eine enorme Bedeutung der Zytokine in pathologischen Prozessen berichtet. Ein Teil der Zytokine ist an der Tumorgenese, sowie an tumorassoziierten Entzündungsreaktionen beteiligt.

Von einigen Zytokinen wurde berichtet, dass sie in erhöhten Spiegeln im Aszites bei Ovarialkarzinomen vorliegen. Es ist daher von enormer Relevanz die löslichen Bestandteile des Aszites zu charakterisieren und deren Einfluss auf das Verhalten der Tumorzellen zu verstehen. Am besten untersucht ist bislang die Rolle des Wachstumsfaktors VEGF. Dank weitreichender Forschung ist VEGF derzeit einer der Hauptangriffspunkte der Therapie des malignen Aszites. Neben dem VEGF scheinen auch andere Zytokine eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression und im Auftreten von malignem Aszites als Metastasierungsweg zu spielen. Erhöhte Spiegel von IL-6 im Aszites sind signifikant mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben assoziiert. IL-6 und IL-8 Spiegel waren in einer Untersuchung signifikant niedriger bei Patienten, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten (Lane et al., 2011).

Es gibt darüber hinaus aber noch weitere Zytokine, deren Rolle in der Pathogenese des Ovarialkarzinoms weitestgehend unerforscht ist. Eines davon ist Leptin, was zunehmend in den Fokus der Forschung gerät und womöglich an der Progression des Ovarialkarzinoms beteiligt ist.

2.3 Leptin

Leptin ist ein 16 kD großes Proteohormon, das eine Rolle in der Regulation des Energiehaushaltes von Menschen und Säugetieren spielt. Es wird durch das Ob-Gen kodiert und hauptsächlich in Adipozyten produziert, weswegen es auch zu den Adipokinen gezählt wird. Darüber hinaus wird das Hormon in kleineren Mengen auch in der Plazenta, der Magenschleimhaut, dem Brustgewebe, dem Knochenmark, der Skelettmuskulatur und den regulatorischen Zentren Hypophyse und Hypothalamus exprimiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Zunahme an Fettgewebe den adäquaten Stimulus für eine gesteigerte Leptinsekretion darstellt. Es konnten zwei Kerngebiete im Hypothalamus, der Nucleus arcuatus und Nucleus paraventricularis, identifiziert

werden, die durch die Expression von Leptin-Rezeptoren (Ob-R) das Signal aufnehmen und durch intrazelluläre Signalwege entsprechende Effekte vermitteln. Die Rezeptoren gehören zu den Klasse I-Zytokinrezeptoren. Bei Bindung von Leptin an die Rezeptoren im Nucleus arcuatus wird die Bildung der appetitsteigernden Neuropeptide AgRP (Agouti-related protein), NPY (Neuropeptid Y) und MCH (Melanin-concentrating hormone) inhibiert. Bei Stimulierung des Nucleus paraventricularis wird hingegen die Synthese der anorektisch wirkenden Hormone CART (Kokain- und Amphetamin-reguliertes Transkript), alpha-MSH (alpha-Melanozyten-stimulisierendes Hormon) und CRH (Corticotropin-releasing hormone) induziert. Hauptsächliches Effektorsystem stellt das sympathische Nervensystem dar, das über eine Steigerung des Stoffwechsels zu einem erhöhten Energieumsatz führt. Im peripheren Gewebe moduliert Leptin die Homöostase zwischen Glukose und Insulin.

Es wird angenommen, dass Leptin auf diese Weise einen Sensor für die Fettmasse des Körpers darstellt und physiologischerweise über die Regulation von Energieaufnahme und Energieabgabe zu einer Energiebalance führt. Die genauen Mechanismen sind dabei im menschlichen Organismus noch weitgehend ungeklärt. So steht Übergewicht zwar im Zusammenhang mit einem erhöhten Serum-Leptinspiegel, doch die hohe interindividuelle Variabilität des Leptinspiegels lässt sich dadurch nicht ausreichend erklären. Ein wesentlicher Faktor scheint über das Gewicht hinaus das Geschlecht zu sein, denn Frauen weisen in allen Gewichtsklassen höhere Leptinspiegel als Männer auf. Ob dies allein auf den höheren Fettanteil am Körpergewicht bei Frauen zurückzuführen ist, bleibt bislang unklar. Hatte man bei Entdeckung von Leptin in den 90er Jahren noch angenommen, durch Substitution von Leptin bei adipösen Menschen eine Gewichtsabnahme zu induzieren, musste man feststellen, dass übergewichtige Menschen sogar stark erhöhte Leptinspiegel aufweisen und eine Leptinresistenz den physiologischen Regulationssensor außer Kraft zu setzen scheint (Jéquier, 2002).

Neben der Funktion im Energiehaushalt wurden zunehmend Kenntnisse gewonnen, dass Leptin eine Rolle in der Tumorphathologie spielt, insbesondere da Übergewicht einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung zahlreicher Karzinome darstellt. Es wird angenommen, dass Leptin ein Mediator von Entzündungsvorgängen, Angiogenese, Proliferation und Apoptose ist. Die molekularen Zusammenhänge sind jedoch noch weitestgehend unbekannt (Vansaun, 2013).

Wie bereits beschrieben (*siehe 2.1.2 Risikofaktoren*) stellt Übergewicht auch für die Entwicklung des Ovarialkarzinoms einen unabhängigen Risikofaktor dar, sodass über die Bedeutung von Leptin im Tumorprogress diskutiert wird.

Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass Leptin in-vitro die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen steigert und die Apoptose inhibiert (Chen et al., 2013). Die genauen molekularen Zusammenhänge, sowie die intrazellulären Signalwege, die den Effekt vermitteln, sind noch weitestgehend unerforscht. Darüber hinaus existieren bis jetzt nur äußerst spärliche Ergebnisse aus klinischen in-vivo Untersuchungen zu den Leptinspiegeln im Serum und Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Eine Studie von Matte et al. konnte erhöhte Spiegel von Leptin im Aszites nachweisen. Diese Studie bezog sich allerdings nur auf zehn Patientinnen (Matte et al., 2012).

Es ist demnach von Wichtigkeit und Interesse parallel den Zusammenhang zwischen Leptin und Tumorzellverhalten einerseits, sowie Leptin und klinischem Ergebnis der Patientinnen andererseits zu analysieren.

2.4 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist es die Zusammensetzung löslicher Bestandteile des Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom zu analysieren. Dazu sollen mithilfe immunologischer Methoden die Spiegel von ausgewählten

Zytokinen bestimmt werden. Anhand dieser Daten soll eine Korrelation der Zytokinspiegel mit dem rezidivfreien Überleben der Patientinnen erfolgen. Als ein Zytokin mit möglicherweise besonderer Bedeutung für den Progress des Ovarialkarzinoms hat die Arbeit darüber hinaus zum Ziel in in-vitro Experimenten den Einfluss von Leptin auf das Verhalten von Ovarialkarzinomzellen zu charakterisieren. Dabei stehen insbesondere die Proliferation unter Leptinstimulation im Fokus. Da die Angiogenese ein wichtiger Faktor in der Tumorprogression ist, soll mit Hilfe von HUVEC ein Angiogenese – Matrigelassay etabliert werden, anhand dessen die Netzbildung als Maß für die Angiogenese untersucht werden kann. Es sollen zusätzlich erste Experimente mit Leptin als potentieller Stimulator der Angiogenese erfolgen. Um die molekularen Mechanismen weiter zu bestimmen, ist es nötig mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden die intrazellulären Signalwege, die das Leptinsignal vermitteln, zu analysieren.

Die so gewonnenen Ergebnissen helfen möglicherweise die Pathogenese des Ovarialkarzinoms weiter zu verstehen und prognostisch bedeutende Faktoren für den Tumorprogress zu identifizieren. Die Charakterisierung von potenziellen Angriffspunkten in der Therapie des Ovarialkarzinoms könnte in Zukunft zu verbesserten Therapieoptionen in Form von adjuvanter oder neoadjuvanter Chemotherapie führen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklaven Bioclav und Fedegari	Schütt, Olching
Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Brutschrank BBD6220 (CO ₂ -begasbar, 37°C)	Heraeus, Hanau
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Electrophoresis Power Supply E815 + E835	Consort, Turnhout (Belgien)
Electrophoresis Power Supply 1000/500	Bio-Rad, München
ELISA-Reader SPECTRA MAX340	MWG Biotech, Ebersberg
Eppendorf Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage Sartorius Research R200D	Sartorius, Göttingen
Filmkassette BAS cassette	Fujifilm, Midwest (USA)
Filmkassette Biomax Cassette Eastman	Kodak Co, Rochester (USA)
Heizblock HBT 130	HLC, Göttingen
Horizontalschüttler	Heidolph, Schwabach
Kühlzentrifuge J2-21 M/E mit Rotor JA-20	Beckmann, München
Leica DMR-Fluoreszenzmikroskop mit Digitalkamera (INTAS)	Leica, Wetzlar
Leica DMI3000B“ Mikroskop	Leica, Wetzlar

Leitz Labovert Mikroskop	Leitz, Wetzlar
Magnetrührer MR2002 und MR3001 (beheizbar) Mikroliter-Spritze Milli-Q Water System Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System Multifuge 3L-R (Kühlzentrifuge)	Heidolph, Schwabach Hamilton, Bonaduz (Schweiz) Millipore, Eschborn Bio-Rad, München Heraeus, Hanau
NanoDrop ND-1000 Neubauer-Zählkammer	PeqLab, Erlangen Marienfeld GmbH, Lauda- Königshofen
Perfect Blue™ Gelsystem Mini S + L Perfect Blue™ Semi Dry-Elektroblotter Sedec™ pH-Meter Inolab pH720 Photometer Ultrospec 3000 Pipetten Research Pipetboy Acu Präzisionswaage Kern	PeqLab, Erlangen PeqLab, Erlangen Inolab, Weilheim Pharmacia Biotech, Freiburg Eppendorf, Hamburg Integra Bioscience, Zürich Balingen-Frommern
Real time PCR-Maschine Mx3000P Röntgenfilm Entwicklertasche X-Omat 2000 Prozessor	Stratagene, Amsterdam (Niederlande) Kodak, Rochester (USA)
SDS-PAGE Mini-Protean II Sterilbank LaminAir HA2448 Stickstoff Tank Chronos Biosafe	Bio-Rad, München Heraeus, Hanau Messer Griesheim, Sulzbach
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Universalwaage Scout Pro	Ohaus, Pine Brook (USA)
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach

xCELLigence RTCA DP System	Acea Biosciences, Bremen
----------------------------	--------------------------

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Clear Diamond Seal	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
Immobilon P	Millipore, Bedford (USA)
Kryoröhrchen 1 ml	Nunc, Wiesbaden
Einfrierbox Nalgene Cryo	Neerisje, (Belgien)
Parafilm	American National Can, Neenah (USA)
Pasteurpipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
PCR-Tubes (0,2 ml)	PeqLab, Erlangen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter	Sorenson BioScience, Salt Lake City (USA)
Platten 96-well, PP, V96	Fisher Scientific, Hamburg
Polypropylen Reaktionsgefäße 15 ml + 50 ml	Greiner, Solingen und Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid)	Millipore, Eschborn
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme: Fuji Film Super RX	Fuji, Tokio (Japan)
Röntgenfilmkassetten	Rego, Augsburg
Steritop Express Plus-Filter (0,22 m)	Millipore, Bedford (USA)
Thermo Fast 96 PCR plate (weiß)	Thermo Fisher Scientific, Hamburg

Whatman-Filterpapier	Schleicher und Schuell, Dassel
Zellkulturschalen 6 cm und 10 cm	Greiner, Nürlingen und Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten 6-well, 24-well, 48-well und 96-well	Greiner, Nürlingen und Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Nunc, Wiesbaden

3.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	GE Healthcare Bio-Sciences, München
<i>Aqua ad injectabilia</i> (A. a. i.)	Braun, Melsungen
β-Mercapto-Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Butanol	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut (EtOH)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamin Tetraacetat (EDTA)	Gerbu, Gaiberg
Formaldehyd ~37%	Merck, Darmstadt
HEPES	Gerbu, Gaiberg
Hoechst 33258	Invitrogen, Karlsruhe

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Luminata forte Western HRP Substrate	Millipore, Eschborn
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol (MetOH)	Merck, Darmstadt
Milchpulver, blotting grade	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88 (Polyvinylalkohol)	Calbiochem (Merck), Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Proteinase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure (H ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trishydroxymethylaminomethan (Tris Base)	Acros Organics (Belgien)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20 (Polysorbat 20)	Merck, Darmstadt

3.1.4 Puffer und Lösungen

3.1.4.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
A. a. i. (Aqua ad iniectabilia)	Braun, Melsungen
H ₂ O	Milli-Q gereinigt und autoklaviert

PBS (Phosphate Buffered Saline)	Na ₂ HPO ₄ 6,5 mM KH ₂ PO ₄ 1,5 mM KCl 2,5 mM NaCl 140 mM pH 7,2; autoklaviert
TBS (Tris Buffered Saline)	Tris-HCl pH 7,4 50 mM NaCl 150 mM autoklaviert
TBS-T (Tris Buffered Saline – Tween)	TBS mit 0,05 % Tween 20

3.1.4.2 Spezielle Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
APS-Lösung	10-%ig (w / v) in H ₂ O
Flag-Lysepuffer	60 mM Tris 30 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Triton-X-100
Hoechst 33258 Stammlösung	2 mg / ml
SDS-Lösung	10-%ig (w / v) in H ₂ O

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Puffer	Zusammensetzung
5 x SDS-Laufpuffer	500 mM Tris

	1,92 M Glycin 0,5 % SDS
5 x SDS-Probenpuffer	50 mM Tris-HCl, pH 6,8 10% Glycin 1 % SDS 50 mM DTT 0,01 % (w / v) Bromphenolblau
Sammelgellösung	4 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 188 mM Tris-HCl, pH 6,8 Diese Lösung wurde steril filtriert und entgast Kurz vor Gebrauch zugefügt: 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,01 % TEMED
Trenngellösung	8– 15 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 188 mM Tris-HCl, pH 8,8 Diese Lösung wurde steril filtriert und entgast. Kurz vor Gebrauch zugefügt: 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,01 % TEMED

Western Blot

Puffer	Zusammensetzung
10 x Blot Puffer Semi-Dry (PVDF)	250 mM Tris 1,5 M Glycin
1 x Blot Puffer Semi-Dry (PVDF)	100 ml 10 x Blot Puffer Semi-Dry (PVDF) 100 ml Methanol 800 ml H ₂ O

3.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Zellkulturmedium	Hersteller
DMEM mit L-Glutamin (Dulbeccos Modified Eagle Medium – High Glucose)	PAA, Cölbe
EBM-2 + Zusätze = EGM-2	Lonza, Basel (Schweiz)
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
McCoys 5A Medium	Thermo Fisher Scientific, Hamburg
(Penicillin 10.000 U / ml; Streptomycin 10 mg / ml)	PAA, Cölbe
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Lonza, Basel (Schweiz)
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe

Zu den Zellkulturmedien wurden standardmäßig 10% (v / v) FCS (DMEM und McCoy's 5A Medium) bzw. 2% (v / v) FCS (EGM-2) und 1% (v / v) Penicillin/Streptomycin zugefügt. Davon abweichende Bedingungen sind an entsprechender Stelle aufgeführt.

Extrazelluläre Matrixproteine für Zellkultur:

Matrix	Hersteller
Gelatine 1%	Sigma Aldrich, Steinheim
Matrigel Basement Membrane Matrix	BD Biosciences
Matrigel Basement Membrane Matrix, Growth Factor Reduced	BD Biosciences

3.1.6 Kits

Kit	Hersteller
Absolute QPCR SYBR Green Mix (2 x)	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
NucleoSpin RNA Kit	Macherey-Nagel, Düren
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden

ELISA-Kits:

Zytokin	Format	Hersteller
ANGPTL-4	„Ready-SET-go!“-ELISA	eBioscience
CCL-2 (MCP-1)	„Ready-SET-go!“-ELISA	eBioscience
GM-CSF	„Ready-SET-go!“-ELISA	eBioscience
IL-1 β	„Ready-SET-go!“-ELISA	eBioscience
IL-4	„Ready-SET-go!“-ELISA	eBioscience
IL-6	„Ready-SET-go!“-ELISA	eBioscience
IL-10	„Ready-SET-go!“-ELISA	eBioscience
IL-12	„Ready-SET-go!“-ELISA	eBioscience
IL-13	„Ready-SET-go!“-ELISA	eBioscience
IL-23	„Ready-SET-go!“-ELISA	eBioscience
Leptin	„Ready-SET-go!“-ELISA	eBioscience
LIF	„Platinum“-ELISA	eBioscience
TGF- β	„Ready-SET-go!“-ELISA	eBioscience
TNF- α	„Ready-SET-go!“-ELISA	eBioscience
VEGF-A	„Platinum“-ELISA	eBioscience
VEGF-C	„Platinum“-ELISA	eBioscience

Die aufgeführten Kits wurden, falls nicht angegeben, nach Herstellerdaten verwendet.

3.1.7 Primer

Die für die RT-PCR und qPCR verwendeten Primersequenzen wurden verschiedenen Datenbanken entnommen oder wurden mit Hilfe des IDT Programms / der Software APE (Wayne Davis) entworfen. Bei der jeweiligen Sequenz wurde darauf geachtet, dass das Amplikon Exon-Exon übergreifend lag um zu verhindern, dass Rückstände von genomischer DNA fälschlicherweise mit amplifiziert werden. Die Primer wurden vom Hersteller lyophilisiert geliefert und nach Herstellerangaben in A. a. i. gelöst. Die 100µM Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

Genname	Primernamen
ABCA-1	ATP-binding cassette transporter-1
(MRP)L27	Mitochondrial ribosomal protein L 27
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
SOCS-3	Suppressor of cytokine signaling-3
TBP	TATA-box-binding protein

3.1.8 Enzyme und Proteinstandards

Enzym	Hersteller
Prime RNase Inhibitor (30 U / µl)	Eppendorf, Hamburg

Proteinstandard	Hersteller
Page Ruler <i>"Prestained Protein Ladder"</i>	Fermentas, St. Leon-Rot

3.1.9 Antikörper

Erstantikörper	Hersteller	Verdünnung
anti-Akt-1/2/3 (Kaninchen, polyklonal)	Santa Cruz, Heidelberg	1:1000
anti-pAkt-1/2/3 (Maus, polyklonal)	Santa Cruz, Heidelberg	1:1000
anti-Erk-1/2 (Kaninchen, polyklonal)	Santa Cruz, Heidelberg	1:2000
anti-pErk-1/2 (Maus, polyklonal)	Santa Cruz, Heidelberg	1:4000
anti-LDH (Kaninchen, polyklonal)	Santa Cruz, Heidelberg	1:2000
anti-Stat-3 (Maus, polyklonal)	Cell signaling, Leiden (NL)	1:5000
anti-pStat-3 Tyr705 (Kaninchen, polyklonal)	Cell signaling, Leiden (NL)	1:1000
anti-ZO1-1A12, Alexa Fluor 488-gekoppelt (Maus, monoklonal)	Thermo Fisher Scientific, Hamburg	1:100

Zweitantikörper	Hersteller	Verdünnung
Ziege-anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt	Cell signaling	1:5000
Ziege-anti-Maus, HRP-gekoppelt	Cell signaling	1:3000

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Antikörper in 5 % Milchpulver (w/v) in TBST-T gelöst, phosphorylierungs-spezifische Antikörper in 3 % BSA (w/v) in TBS-T.

3.1.10 Zytokine und Wachstumsfaktoren

Zytokin/Wachstumsfaktor	Hersteller	Lösung
IL-6	Sigma-Aldrich, Steinheim	0,5 mg / ml in 10 mM Essigsäure
Leptin	R&D, Wiesbaden- Nordenstadt, Sigma-Aldrich, Steinheim	1 mg / ml in 20 mM Tris-HCl pH 8,0
VEGF	Sigma-Aldrich, Steinheim	0,1 mg / ml in A.a.i.

3.1.11 Auswertungssoftware

Software	Hersteller
Analyse Software NanoDrop 3.01	Peqlab, Erlangen
GraphPad Prism 5 und 6	GraphPad Software, La Jolla (USA)
Image Lab™ Software, Version 5.01	Bio-Rad Laboratories, München
Microsoft Office 2007 (Excel, Powerpoint, Word, Picture Manager)	Microsoft, Unterschleißheim
Mx3000P Betriebs- und Analyse Software, Version 3.20	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
Photoshop CS6	Adobe Systems, München
xCELLigence RTCA DP System Software	Acea Biosciences, Bremen

PCR Primerdesign

Datenbank	Zugriff
Integrated DNA Technologies (Schmidt et al.)	http://www.idtdna.com/SciTools/SciTools.aspx
Primer Bank (qPCR Primer Database)	http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html

Quantitativ PCR Primer Database (QPPD)	http://www.lpgws.nci.nih.gov/cgi-bin/PrimerViewer
Universal Probe Library	http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/center.jsp?id=030000

3.2 Methoden

3.2.1 Biochemische und molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Für die Isolierung von RNA aus Zellkultur wurde das „NucleoSpin® RNA“ Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben verwendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Säulenchromatographie.

Die Zellen wurden in 350 µl Lysepuffer (RA1 + 3,5 µl β-Mercaptoethanol) lysiert. Die im Lysepuffer enthaltenen chaotropen Ionen denaturieren RNasen, wodurch die vorzeitige Degradation der RNA verhindert wird. Darüber hinaus wurde unter möglichst sterilen Bedingungen und Nutzung von RNase-freiem Material gearbeitet. Die RNA bindet anschließend an eine Silicamembran. Ebenfalls bindende Rückstände von DNA wurden durch einen 15-minütigen Verdau mit rekombinanter RNase-freier DNase bei Raumtemperatur entfernt. Durch mehrere Waschschrte wurde die RNA aufgereinigt und zweimal in 40µl RNase- freies Wasser eluiert. Die Lagerung von RNA Proben erfolgte stets bei -80°C.

3.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Um die Konzentration der RNA in den Proben zu bestimmen, wurde das Prinzip der photometrischen Quantifizierung von Nukleinsäuren genutzt. Hierbei wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, da Nukleinsäuren hier aufgrund ihrer heterozyklischen Basen ihr Absorptionsmaximum besitzen. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei einem Gehalt von ungefähr 40 µg / ml RNA. Zur Bestimmung der Reinheit der RNA-Probe wird zusätzlich die OD bei 280 nm gemessen, da bei dieser Wellenlänge Proteine und Phenol ihr Absorptionsmaximum haben. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} ist somit ein Maß für die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Die Messung erfolgte mit 1 µl unverdünnter Probe am NanoDrop (Peglab, Erlangen). Die zugehörige Software (NanoDrop 3.01) berechnet die Konzentration direkt nach folgender Formel:

$$\text{Konz. RNA [ng / µl]} = OD_{260} \times 40 \text{ ng / µl}$$

3.2.1.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die reverse Transkription dient der Umschreibung von RNA in dazu komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe einer reversen Transkriptase. Die Verwendung von unspezifischen Oligonukleotidprimern erlaubt die Umschreibung der gesamten mRNA in cDNA. In einer anschließenden quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) kann die cDNA weiter analysiert werden.

Zur cDNA-Synthese wurde das „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben verwendet (s. Tab. 3.1). Dabei wurden 500 ng RNA in 20 µl Gesamtreaktionsansätzen in einem bestimmten Temperaturprofil für 40 Minuten inkubiert (s. Tab. 3.2).

Reaktionskomponente	Volumen pro Ansatz
„5x iScript reaction mix“	4 µl
„iScript reverse transcriptase“	1 µl
RNA- <i>template</i> (500ng)	x µl
Nuclease-freies H ₂ O	add 20 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tab. 3.1 Standardprotokoll reverse Transkription

Dauer	Temperatur
5 min	RT
30 min	42°C
5 min	85°C

Tab. 3.2 Temperaturprofil reverse Transkription

Bei allen Arbeiten mit RNA und DNA wurde stets mit gestopften Pipettenspitzen gearbeitet um Kontaminationen zu vermeiden. Die Proben wurden während dem Arbeiten stets gekühlt.

3.2.1.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR oder Real-Time-PCR)

Die PCR dient der *in-vitro* Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen. Durch die Verwendung spezifischer Oligonukleotidprimer, die die Zielsequenz flankieren, lassen sich selektiv bestimmte Abschnitte der DNA exponentiell vermehren. Das katalysierende Enzym ist dabei eine thermostabile DNA-

Polymerase. Bei Vorliegen von ausreichend Desoxynukleosidtriphosphaten, entsprechenden Puffern und zwei kurzen Oligonukleotidprimern kann so aus einem DNA-Einzelstrang ein DNA-Doppelstrang synthetisiert werden. Das Prinzip beruht auf der wiederholten Abfolge von Reaktionszyklen, die jeweils aus drei durch die Reaktionstemperatur charakterisierten Schritten bestehen.

In einem ersten Denaturierungsschritt (95 °C) wird die Taq-Polymerase aktiviert. Anschließend folgt die zyklische Reaktion. Durch eine Hitzedenaturierung (95 °C) liegt die DNA einzelsträngig vor, sodass im nächsten Schritt die Primer spezifisch an komplementäre DNA-Sequenzen binden können (Hybridisierung, 60 °C). Abschließend erfolgt die Elongation (72 °C), bei der die Taq-DNA-Polymerase unter Verwendung von dNTPs den Komplementärstrang synthetisiert. Dieser Zyklus wurde 40 Mal wiederholt. Bei idealen Bedingungen wird die Ausgangs-DNA theoretisch bei jedem Zyklus verdoppelt.

Bei der quantitativen „real-time“-PCR ist es möglich Expressionsniveaus für bestimmte Gene kontinuierlich in Echtzeit zu analysieren. Die hier durchgeführte „real-time“-PCR (qPCR) basiert auf der Nutzung von SYBR[®]-Green. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA und emittiert bei entsprechender Anregung ein Fluoreszenzsignal. Nach jedem Zyklus des PCR-Laufs wird dieses Signal gemessen. Über weite Bereiche eines PCR-Laufs verhalten sich zunehmende Menge des Amplikons und Fluoreszenzsignalstärke proportional zueinander. Da dabei nur spezifische Sequenzen amplifiziert werden, kann so eine quantitative Aussage über das ursprüngliche Expressionsniveau des Gens getroffen werden.

Da aufgrund der Eigenschaften von SYBR[®]-Green auch unspezifische Amplifikate und Primer-Dimere einen Anstieg in der Fluoreszenz verursachen können, muss eine abschließende Analyse der Schmelzkurven vorgenommen werden, um eine qualitative Aussage über die Amplifikate treffen zu können.

Mit Hilfe des Fertigmix „Absolute QPCR SYBR[®]-Green Mix (2x)“ (Thermo Fischer Scientific, Hamburg) (Taq-DNA-Polymerase, dNTPs, Puffer, SYBR[®]-Green) wurde ein Reaktionsansatz folgendermaßen zusammengesetzt:

Absolute QPCR SYBR [®] -Green Mix	10 µl
H ₂ O	4,8 µl
Primermix (je 10 µM)	0,2 µl
Gesamtvolumen	15 µl

Dieser genspezifische Mix (15 µl) wurde in die Vertiefungen einer weißen 96-well-Platte vorgelegt und mit 5 µl einer vorverdünnten (1:50) cDNA versetzt.

Die Reaktionen wurden immer im Triplikat angesetzt, um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen. Zum Ausschluss von falsch positiven Ergebnissen wurden Negativkontrollen mit A. a. i. routinemäßig im Triplikat mitgeführt.

Der PCR-Lauf erfolgte in einem Mx3000P qPCR Gerät (Stratagene, Niederlande) nach einem Standardprotokoll (s. *Tab. 3.3*). Zur Auswertung der Daten wurde die zugehörige Software des Geräts sowie das Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel, Microsoft, Unterschleißheim) genutzt. Die Normalisierung der Expressionsdaten erfolgte mit Hilfe der Haushaltsgene *Rpl27* (L27) und TBP (*TATA-Box-Binding-Protein*). Die Daten wurden anschließend als relative Expression dargestellt.

Schritt	Temperatur	Dauer	Durchläufe
Taq-Polymerase-Aktivierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	40
Hybridisierung	60 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	

Tab. 3.3 Standard qPCR-Protokoll

Schmelzkurve von 60 °C bis 95 °C (0,5 °C Erhöhung je Zyklus; 70 Zyklen)

3.2.1.5 Herstellen von Gesamtzell-Proteinextrakten

Reaktionskomponente	Volumen pro Ansatz
Flag-Lysepuffer	79 µl
Natriumpyrophosphat	10 µl
Phosphatase-Inhibitor	10 µl
Protease-Inhibitor	1 µl
Gesamtvolumen	100 µl

Tab. 3.4 Zusammensetzung Lysepuffer zur Proteinextraktion

Zur Gewinnung von Gesamtzell-Proteinextrakten wurden die Zellen einer 6-well-Zellkulturplatte einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 100 µl Lysepuffer pro well lysiert (s. Tab. 3.4). Mittels eines Zellschabers wurde das Lysat abgeschabt, in ein 1 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 min auf

Eis inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 13500 UpM für 15 min. Proteinlysate wurden bei -20 °C gelagert.

3.2.1.6 Proteinkonzentrationsbestimmung von Gesamtzell-Proteinextrakten

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten erfolgte mit Hilfe des „Bio-Rad Protein Assay“ (Bio-Rad, München). Die Methode nach Bradford beruht auf der Änderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes „Coomassie Brilliant Blue G-250“ von 465 nm zu 595 nm Wellenlänge nach Bindung an Proteine. Anhand einer BSA-Standardkurve kann so in Abhängigkeit von der Absorption bei 595 nm Wellenlänge die Proteinkonzentration ermittelt werden.

Das Farbkonzentrat wurde zunächst 1:5 mit A. a. i. verdünnt. Anschließend wurden je 4 µl des 1:10 vorverdünnten Proteinlysats im Triplikат in die Vertiefungen einer Microtiter-Platte gegeben und mit 180 µl Farblösung versetzt. Zum Ausschluss von falsch positiven Werten wurde standardmäßig ein Leerwert mit 180 µl Farblösung im Triplikат mitgeführt. Nach 10 min Inkubation wurde die Absorption der Proben bei 595 nm Wellenlänge in dem Microplate-Reader „ELISA-Reader SPECTRA MAX340“ (MWG Biotech, Ebersberg) photometrisch gemessen.

3.2.1.7 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteine in einem Gesamtzellproteinextrakt weiter zu analysieren, kann man sie mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrem Molekulargewicht entsprechend in einem elektrischen Feld auftrennen. Um zu erreichen, dass die Auftrennung nur vom Molekulargewicht und nicht von der Ladung abhängig ist, werden die Proteine mit dem negativ geladenen Detergens Sodiumdodecylsulfat (SDS) versetzt. Die Bindung von SDS führt zu

einer Überdeckung der Eigenladung der Proteine. Zusätzlich führen die sich abstoßenden negativen Ladungen des SDS gemeinsam mit einem einleitenden Hitzedenaturierungsschritt der Proteinproben (15 min bei 95 °C) zu einer Entfaltung und Linearisierung der Proteine.

Die Trennmatrix nach dem von Laemmli beschriebenen Prinzip besteht aus einem diskontinuierlichen Gel auf Polyacrylamidbasis. Dabei nutzt man ein Sammelgel und ein Trenngel, die sich in ihrem pH Wert und in ihrer Acrylamid-Konzentration unterscheiden. Das Sammelgel mit leicht saurem pH Wert (pH 6,8) und niedriger Polyacrylamid-Konzentration (4 %) dient dem Vereinigen der Proteine in einer Laufront. Das Trenngel mit basischem pH Wert (pH 8,8) und höherer Polyacrylamid-Konzentration (8-12,5 %) dient durch den auftretenden Siebeffekt dem Auftrennen der Proteine. Die Dichte des Gels war dabei von dem Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins abhängig. Proteine im Bereich von 40 – 60 kDa wurden in 12,5 % Gelen aufgetrennt. Proteine mit höherem Molekulargewicht wurden in 8 % Gelen separiert. Für beide Gele wurde ein Tris-Glycin-Puffer verwendet.

Die Gele wurden nacheinander zwischen zwei Glasplatten gegossen, erst das Trenngel und darauf das Sammelgel. Die Polymerisation des Gels wurde jeweils durch Zugabe von 10 µl / ml einer 10-%igen APS-Lösung (Ammoniumpersulfat, Radikalbildner) und 1 µl / ml TEMED-Lösung (Tetramethylethyldiamin, Katalysator) initiiert.

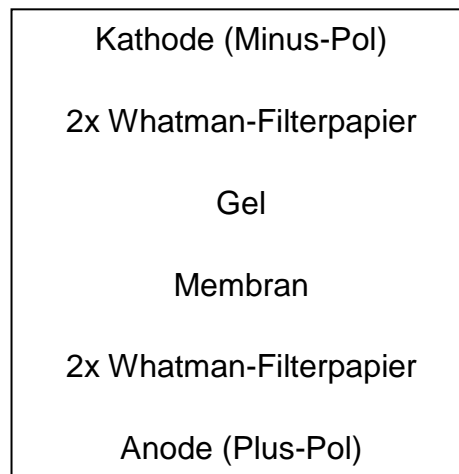
Zur Probenvorbereitung wurden gleiche Mengen Protein (5 - 10 µg Gesamtprotein) mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und 15 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurde die Gelelektrophorese bei kleinen Gelen (Trenngelgröße 6,5 x 8,5 cm) bei einer Spannung von 20-25 mA bzw. bei großen Gelen (Trenngelgröße 6,5 x 17 cm) bei 40 – 50 mA über 60 – 90 min durchgeführt. Um nach der Auftrennung eine Aussage über die Größe der Proteine machen zu können, wurde ein angefärbter Proteinstandard („Page Ruler Prestained Protein Ladder“; Fermentas, St. Leon-Rot) mitgeführt. Für die weitere Analyse wurden die Proteine auf eine Membran (PVDF) transferiert.

3.2.1.8 Western Blot/ Immunblot

Beim Western Blot Verfahren werden die zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Elektrottransfer (Semi-Dry Verfahren) auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran transferiert, wo sie im Anschluss gezielt immunologisch nachgewiesen werden können.

Elektrotransfer

Im Semi-Dry Verfahren wird das Trenngel aus der SDS-PAGE zusammen mit der Trägermembran luftblasenfrei zwischen mehrere Schichten von mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren gelegt. Senkrecht zu diesem Aufbau wird ein elektrisches Feld angelegt, durch das die Proteine aus dem Gel in Richtung Anode auf die Membran transferiert werden. Die Membran wird zuvor mit Methanol benetzt und wie die anderen Bestandteile im Transferpuffer äquilibriert. Der Schichtaufbau gestaltet sich folgendermaßen:



Dieser Transfer fand bei einer angelegten Spannung von 60 – 75 mA (kleines Trenngel) bzw. 100 – 140 mA (großes Trenngel) über einen Zeitraum von 60 bis 90 min statt.

Immunblot

Die auf der Trägermembran gebundenen Proteine können anschließend durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Hierzu kommen ein spezifischer Primärantikörper und ein sekundäres Immunkonjugat (Sekundärantikörper gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase) zum Einsatz. Um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern, werden zunächst alle freien Bindungsstellen durch Blockierung mit 3 % - BSA-Lösung (zum Nachweis von phosphorylierten Proteinen) bzw. 5 % - Magermilchpulverlösung (zum Nachweis von unphosphorylierten Proteinen) über einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden besetzt. Im nächsten Schritt bindet der Erstantikörper spezifisch über Nacht bei 4 °C an sein Antigen. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T folgt die mindestens vierstündige Inkubation der Membran mit dem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper, der an den Fc-Teil des Erstantikörpers bindet. Für den spezifischen Nachweis der Proteine wurde die Membran nach dreimaligen Waschen mit TBS-T für einige Minuten mit Luminol („Luminata forte Western HRP Substrate“; Millipore, Eschborn) inkubiert. Bei dieser Nachweisreaktion reagiert das Luminol auf die Oxidation durch die Meerrettich-Peroxidase mit der Emission blauer Lichtquanten (Chemolumineszenz). Die Detektion der Chemolumineszenzsignale erfolgte auf zwei verschiedene Weisen. Zum einen durch Exposition eines Röntgenfilms (Fujifilm, Midwest/USA) in einer Filmkassette. Zum Anderen wurde das „Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System“ der Firma Bio-Rad Laboratories, München genutzt. Dabei werden die Chemolumineszenzsignale von einer im Gerät integrierten Kamera registriert und ein digitales Bild erstellt. Die Daten können dann mit der zugehörigen „Image Lab™ Software“, Version 5.01 analysiert werden.

3.2.1.9 „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) bezeichnet ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Mit Hilfe des ELISAs lassen sich unter anderem Proteine (z.B. Zytokine) nachweisen.

Für diese Arbeit wurden ELISA-Kits der Firma eBioscience, Frankfurt gemäß Herstellerangaben verwendet.

Der Antigennachweis beruht bei diesen Assays auf der Nutzung zweier Antikörper („Sandwich-ELISA“). Der „capture“-Antikörper, mit dem eine Microtiterplatte beschichtet ist, bindet das entsprechende Antigen. Durch Waschen wird nichtgebundenes Antigen entfernt. Ein zweiter biotinylierter „detection“-Antikörper bindet an einem anderen Epitop des Antigens. Durch erneutes Waschen wird nicht spezifisch gebundener Antikörper entfernt. Anschließend bindet das Reporterenzym, eine Avidin-HRP (Avidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase). Die Bindung von Biotin durch Avidin ist eine der stärksten nichtkovalenten biologischen Bindungen und dient der Signalverstärkung. Das chromogene Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) wird nach Zugabe durch die HRP oxidiert und färbt sich daher blau (Absorptionsmaximum λ 650 nm). Nach Zugabe von Schwefelsäure als Fixierlösung ergibt sich ein Farbumschlag nach gelb (Absorptionsmaximum λ 450 nm).

Die Konzentration des umgesetzten Substrates entspricht theoretisch der zu bestimmenden Antigenkonzentration. Durch photometrische Messung der Extinktion (optische Dichte = OD) kann mit Hilfe einer Standardkurve von bekannten Antigenkonzentrationen auf die Konzentration des Antigens in der Probe geschlossen werden.

Die Liste von verwendeten ELISA-Kits kann Abschnitt 3.1.6 „Kits“ entnommen werden.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Alle verwendeten Materialien und Lösungen waren autoklaviert, sterilisiert oder steril filtriert.

Zum Ausschluss einer Kontamination mit Mycoplasmen wurden alle 3 Wochen Test mittels Hoechst-Färbung durchgeführt. Kontaminierte Zellen wurden sofort sachgemäß entsorgt.

3.2.2.1 Verwendete Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien können folgender Tabelle entnommen werden (*Tab. 3.5*).

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft	Medium
BG-1	Humane Ovarialkarzinomzelllinie	Dr. S. Reinartz	DMEM 10 % FCS
HUVEC	Humane Endothelzellen aus der Nabelschnur	Dr. S. Müller-Brüsselbach	EGM-2 2 % FCS
Makrophagen	Humane Makrophagen aus Buffy Coat	Tim Schumann	RPMI 10 % FCS
SKOV-3	Humane Ovarialkarzinomzelllinie	ATCC HTB-77	McCoy's 5A Medium 10 % FCS

Tab. 3.5: Verwendete Zelllinien

3.2.2.2 Kultivieren und Passagieren der Zellen

Die in der Tabelle aufgelisteten Zelllinien wurden standardmäßig bei 37° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % in einem CO₂-begasbaren Inkubator (5 % CO₂) auf 10 cm Zellkulturschalen (Greiner, Nürtingen) kultiviert. Die Kulturmedien wurden standardmäßig mit 1 % (v / v) Penicillin (10.000 Units / ml) / Streptomycin (10 mg / ml) versetzt. Für die Kultivierung von HUVECs wurde der Zellschalenboden mit einer Gelatine-Lösung (1%) beschichtet.

Alle 2-4 Tage (HUVEC maximal 80 % Konfluenz) wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde zuerst das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/ EDTA-Lösung für 4-10 Minuten inkubiert. Das Enzym Trypsin ist hierbei für eine kurzfristige Auflösung des Zell-Zell-Adhäsionsapparates verantwortlich. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und im entsprechenden Medium resuspendiert. Zum Schluss wurden die Zellen zur weiteren Kultivierung je nach Zelllinie im Verhältnis 1/3 bis 1/10 auf neue 10 cm Schalen ausplattiert.

3.2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellkulturen

Die Kryokonservierung ermöglicht es Zellen über längere Zeit zu lagern. Nach dem Auftauen nehmen sie ihre physiologischen Stoffwechselprozesse wieder auf.

Dazu wurden die Zellen wie beim Passagieren abgelöst und im entsprechenden Medium resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1000 UpM wurde das Zellpellet in Einfriermedium (Medium + 15 % zusätzliches FCS + 7,5 % DMSO) gelöst und in 1 ml Einfrierröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt. Zur Vermeidung von Kristallisationsschäden wurden die Einfrierröhrchen in eine hierfür vorgesehene Einfrierbox (Nalgene, Neerisje, B(elgien)) gestellt und für etwa einen Tag bei -80° C eingefroren. Im Anschluss daran folgte die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen zunächst 5 min bei 37° C inkubiert. Nach Aufnahme in 10 ml Medium erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 1000 UpM. Das Zellpellet wurde anschließend im entsprechenden Kulturmedium gelöst und die Zellen auf 10 cm Schalen bzw. 6 cm Schalen (HUVECs) ausplattiert.

3.2.2.4 Zählen von Zellen

Um die Gesamtzahl von Zellen auf Kulturschalen zu bestimmen, wurde sowohl eine Neubauer Zählkammer (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) als auch ein automatischer Zellzähler (PecLab, Erlangen) genutzt. Dazu wurden die Zellen wie beim Passagieren von der Zellkulturschale abgelöst und gegebenenfalls verdünnt. Die Quantifizierung mittels Neubauer Zählkammer erfolgte im Duplikat nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Gezählte Zellen von 4 Großquadraten} \times 10000}{4}$$

Zur Nutzung des automatischen Zellzählers wurden 20 µl der Zellsuspension in eine Zellkammer überführt und anschließend durch das Gerät vermessen. Die zugehörige Software ermittelt die Zellzahl pro Milliliter.

3.2.2.5 In-vitro Angiogenese-Modell mittels „BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix“

Der Begriff Angiogenese bezeichnet die Bildung neuer Gefäßstrukturen durch Wachstum bereits bestehender Gefäße mittels Sprossung oder Spaltung. Abzugrenzen ist die Angiogenese von der Vaskulogenese, der de-novo Bildung von Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen.

Die Angiogenese spielt in der Pathogenese von Tumoren eine entscheidende Rolle und ist ein häufiger Angriffspunkt in der Entwicklung moderner Tumortheraeutika.

Ein häufig genutztes Modell zur in-vitro Untersuchung der Angiogenese ist die kurzfristige Kultur von primären Endothelzellen auf Matrigel, einem Gemisch verschiedener Matrixproteine, gewonnen aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Sarkom der Maus. Die Endothelzellen adhärieren dabei zunächst auf der Matrix, wachsen nach zwei bis vier Stunden aufeinander zu und bilden anschließend kapillarähnliche Netzwerke, auch Tubuli genannt. Die Ausbildung dieser Netzwerke ist nach ca. 18 Stunden abgeschlossen, im Anschluss beginnen die gebildeten Strukturen wieder zu degradieren.

Zur Durchführung des Angiogenese-Models im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl das „BD Matrigel Basement Membrane Matrix“ als auch das „BD Matrigel Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced“ der Firma BD Biosciences, Heidelberg verwendet. Letzteres weist eine geringere Konzentration der Wachstumsfaktoren EGF, IGF-1, PDGF und TGF- β auf.

Die Handhabung des „Matrigels“ erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Als Endothelzellen wurden „Human Umbilical Vein Endothelial Cells“ (HUVEC) verwendet.

Experimente mit „BD Matrigel Basement Membrane Matrix“ wurden nach folgendem Schema durchgeführt: Nach Beschichtung von 48-well-Zellkulturplatten mit 150-200 μl / cm^2 „Matrigel“ (c= 5-8mg/dl, Verdünnungen mit serumfreien Medium) wurden die Platten für 30 Minuten bei 37° C inkubiert, um das Gel fest werden zu lassen. Anschließend wurden die Zellen ($1,5 \times 10^5$ pro cm^2) vorsichtig auf das Gel ausplattiert und die Wells mit entsprechendem Medium aufgefüllt.

Experimente mit „BD Matrigel Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced“ erfolgte nach einem leicht moduliertem Schema: HUVEC wurden auf 6-well-Zellkulturplatten, die mit Kollagen beschichtet wurden, ausplattiert und nach der Adhärenz (4h) über Nacht im entsprechenden

Medium unter Stimulierung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen abgelöst und im Triplikate je $1,5 \times 10^5$ Zellen in 100 μ l Medium auf 100 μ l „GFR-Matrigel“ (c= 8mg/ml) in die Vertiefungen einer 96-well-Platte gesetzt. Das „GFR-Matrigel“ und das Medium wurde nochmals mit der jeweiligen Substanz versetzt.

Das Verhalten der HUVEC wurde jeweils mittels Mikroskopie verfolgt. Nach 18 - 24 Stunden erfolgte die fotografische Dokumentation in 5x Vergrößerung mit dem „Leica DMI3000B“ Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar). Zur Analyse der Aufnahmen wurden die Fotos mit „Microsoft Office Picture Manager“ (Microsoft, Unterschleißheim) bearbeitet, um eine klare Darstellung der gebildeten Netzwerke zu erhalten. Im Anschluss wurde eine Quantifizierung durchgeführt, bei der die Anzahl an Verzweigungen und die Anzahl vollständig umschlossener Tubuli berücksichtigt wurden.

3.2.2.6 Proliferationsassay mittels des „xCELLigence RTCA DP“ Systems

Das veränderte Ausmaß der Proliferation von Zellen spielt in der Pathogenese von Malignomen eine entscheidende Rolle. Es existieren viele Methoden um Proliferation zu messen, allerdings sind viele davon auf eine Endpunktmessung beschränkt.

Das „xCELLigence RTCA DP“ System (Acea Biosciences, Bremen) ermöglicht dynamische Analysen des Verhaltens von Zellen in Echtzeit durch Einsatz eines mikroelektronischen Sensors.

Das System besteht aus einer Kontrolleinheit und einem Analyzer, in dem Fassungen für drei elektronische Platten integriert sind. Jede Platte besteht aus einer Doppelreihe von sechs *wells*, deren Böden mit Mikroelektroden aus Gold beschichtet sind. Die Anheftung von Zellen an den Boden verändert die ionischen Verhältnisse an der Grenze zwischen Elektrode und Medium, da die Plasmamembran der Zellen durch ihre isolierenden Eigenschaften nur einen schwachen Leiter darstellt. Dies führt zu einer erhöhten Impedanz

(Wechselstromwiderstand) der jeweiligen Elektrode. Die kontinuierliche zeitaufgelöste Impedanzmessung erlaubt somit Rückschlüsse auf das Ausmaß der Bedeckung der Elektrode mit Zellen in Echtzeit. Bei dem hierdurch erhobenen Zellstatus spielen sowohl die Zellzahl als auch die Stärke der Adhärenz und die Morphologie der Zellen eine Rolle. Die zugehörige Software des Systems generiert fortlaufend aus den Impedanzmessungen einen dimensionslosen Wert, Zellindex genannt. Auf der Basis des Zellindex können darüber hinaus weitere Analysen vorgenommen werden. Für die Beurteilung der Proliferation ist hier insbesondere die Berechnung der Verdopplungszeit von Bedeutung. Diese wird von der zugehörigen Software berechnet ($\text{Cell index} = A \cdot 2^{(t/\text{CI doubling-time})}$)

Zur Durchführung des Experiments wurden die *wells* jeweils mit 100 µl des entsprechenden Mediums gefüllt und 30 Minuten bei 37° C im Gerät äquilibriert. Nach einer Hintergrundmessung wurde die entsprechende Zellzahl in 100 µl Medium ausplattiert und nachfolgend 30 Minuten zum Absetzen der Zellen inkubiert. Anschließend erfolgte alle 30 Minuten über 4 Tage eine Messung. Die geeignete Zellzahl muss speziell für jede Zelllinie im Vorfeld mittels Titration ermittelt werden. Als optimal ergab sich für die SKOV3-Zellen eine Zellzahl von 2500 Zellen pro *well*.

3.2.3 Klinische Probengewinnung

3.2.3.1 Patientinnenkollektiv und Probengewinnung

Das Patientinnenkollektiv umfasste 31 Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom. Alle befanden sich im fortgeschrittenen Stadium pT3c. Die Karzinome waren bei allen mäßig bis schlecht differenziert (G2 bzw. G3). Bei 31 Patientinnen mit hochgradig serösem Ovarialkarzinom wurden intraoperativ

Aszites-Proben entnommen. Alle Patientinnen unterzogen sich im Universitätsklinikum Gießen-Marburg, Standort Marburg während des Zeitraums von 2011 bis 2014 einer Operation im Rahmen einer Erstlinientherapie. „Informed Consent“ nach den Richtlinien des von der Ethikkommission akzeptierten Protokolls lag von jeder Patientin vor. Die Einschätzung des Erkrankungsstatus erfolgte analog der RECIST Kriterien bzw. mittels Serum-CA-125-Bestimmung, wenn keine Läsion messbar war (nach Empfehlung der „Gynecologic Cancer InterGroup“ (GCIG, www.gcig.igcs.org=CA-125.html)).

3.2.3.2 Datenauswertung

Die Auswertung der Daten in Form von Kaplan-Meier-Kurven und Pearson's r-Korrelation erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 6). Zur Ermittlung des cut-offs wurde der webbasierte Cutoff-Finder Version 2.15.0 (www.molpath.charite.de/cutoff/) mit der Funktion „most significant cutoff“ genutzt. Dieses Programm arbeitet ebenfalls mit R-Funktionen.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Zytokine im malignen Aszites bei Ovarialkarzinom

4.1.1 Quantifizierung ausgewählter Zytokine

Bei 31 Patientinnen mit Ovarialkarzinom wurden intraoperativ Aszites-Proben entnommen. Die Aszites-Proben wurden daraufhin mittels ELISA auf ihre Zytokin-Zusammensetzung untersucht (s. 3.2.1.9). Diese Untersuchung erfolgte aus organisatorischen Gründen teilweise nicht an allen 31 Proben (siehe entsprechende Angabe der Mengensumme (n)).

Von den untersuchten Zytokinen waren die Folgenden nicht oder nur in vereinzelt Proben detektierbar: IL-1 β , IL-4, IL-12, IL-13, GM-CSF, TNF- α , Epiregulin, Amphiregulin.

Die Analyse der gemessenen Werte der Zytokinspiegel ergibt, dass die Zytokinspiegel einer hohen interindividuellen Variabilität unterliegen. Darüber hinaus liegen die Werte der einzelnen Zytokine im Vergleich untereinander auf verschieden hohen Niveaus (s. *Tab. 4.1 und Abb. 4.1*).

Zytokin	MIN	MAX	Median	Mittelwert	STD	n
Protein	14,78	138,81	44,58	48,9	20,2	31
ANGPTL4	18,7	203,99	69	76	49,7	31
CA-125	0	141190	8600	16341,7	29323,1	23
CCL-2	38,3	965	175	215,5	167,7	31
M-CSF	0	9914	948	1778,7	2310,7	31
IL-6	38	5932	1529,5	2450,5	2215	31
IL-10	0	728	188	215,7	153	31
Leptin	214	8326	1454,5	2142,3	2232,7	20
LIF	14	2232	234	563,8	602,7	31
S100 A8	0	9760	0	570,7	1769,6	31
TGF- β	3,07	104,01	26	31	20,7	31
VEGF-A	510	8736	3858,5	4127,4	2737,8	14
VEGF-C	0	2920	405	566,1	629,7	18

Tab. 4.1: Analyse der Werte der Zytokinspiegel [pg/ml] im malignen Aszites

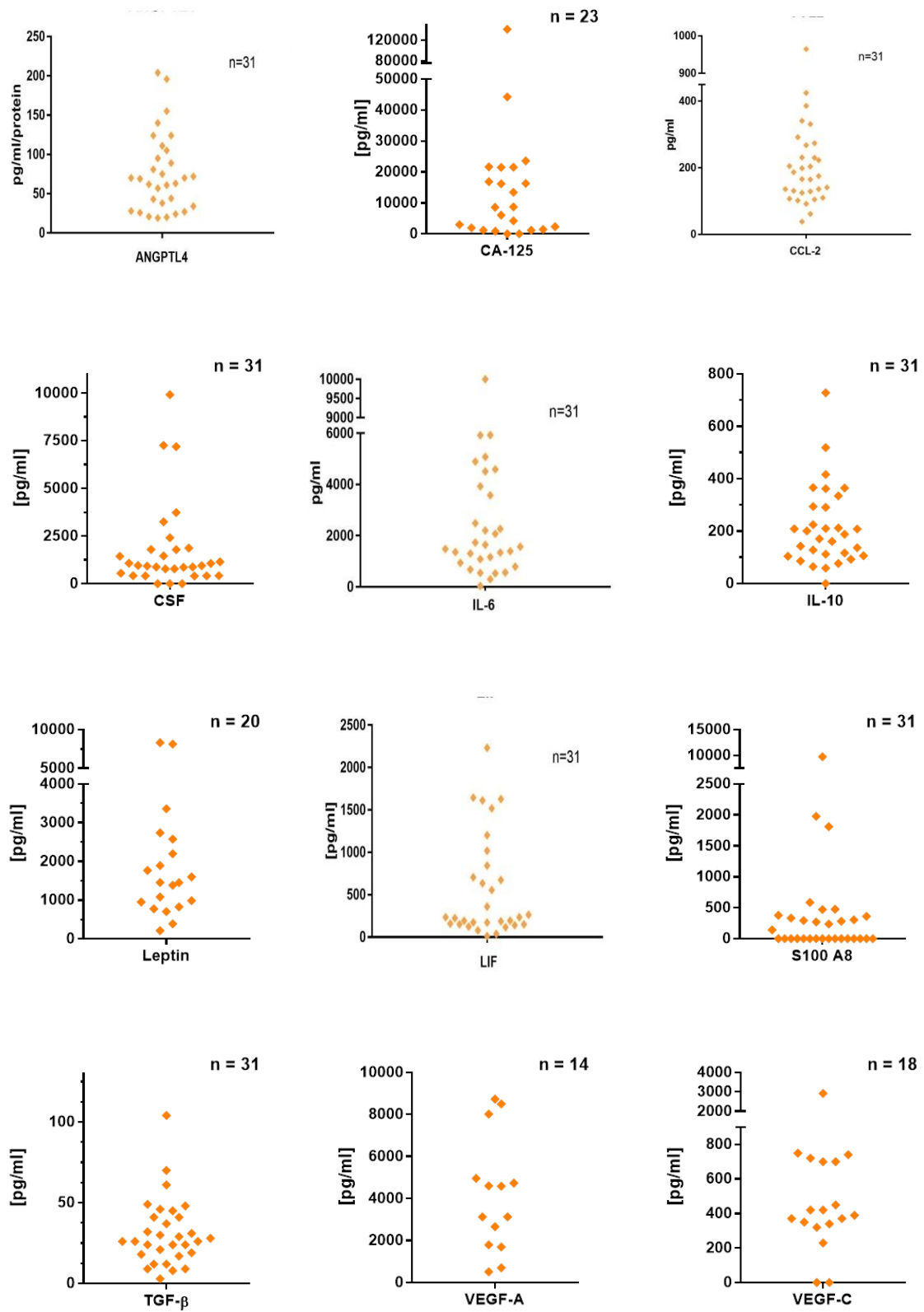


Abb. 4.1 Streudiagramme der Zytokinspiegel im malignen Aszites

4.1.2 Korrelation der Zytokinspiegel untereinander

Um die Daten der Zytokinbestimmung kategorisieren zu können, wurden die Werte auf Korrelationen untereinander untersucht. Hierzu wurde die Pearson r-Korrelation genutzt, deren Korrelationskoeffizient r lineare Zusammenhänge aufzeigt. Zur Beurteilung der errechneten Korrelationskoeffizienten wurden in Abhängigkeit von der Stärke des Korrelationszusammenhangs Gruppen gebildet. Dabei wurde $-0,2 < r < 0,2$ als nicht korrelierend, $r \geq 0,2$ bzw. $r \leq -0,2$ als schwach korrelierend, $r \geq 0,3$ bzw. $r \leq -0,3$ als moderat korrelierend, $r \geq 0,4$ bzw. $r \leq -0,4$ als stark korrelierend und $r \geq 0,7$ bzw. $r \leq -0,7$ als sehr stark korrelierend interpretiert (s. Tab. 4.2 und 4.3).

	CA-125	IL-6	IL-10	Leptin	CCL-2	LIF	M-CSF	VEGF-A	VEGF-C	TGF- β	ANGPT L4	S100 A8
CA-125		0,435	0,089	-0,138	-0,119	0,270	0,783	0,298	-0,002	-0,097	-0,083	0,168
IL-6	0,435		0,385	-0,249	-0,080	0,802	0,114	0,511	-0,087	0,301	0,278	0,315
IL-10	0,089	0,385		0,082	0,086	0,185	-0,268	0,379	0,070	0,326	0,029	0,325
Leptin	-0,138	-0,249	0,082		-0,131	-0,335	-0,050	0,223	0,028	-0,268	0,466	-0,056
CCL-2	-0,119	-0,080	0,086	-0,131		0,055	0,208	0,293	0,043	-0,011	0,048	-0,217
LIF	0,270	0,802	0,185	-0,335	0,055		0,124	0,471	-0,006	-0,223	-0,177	0,205
M-CSF	0,783	0,114	0,268	-0,050	0,208	0,124		0,202	-0,035	-0,224	0,052	0,061
VEGF-A	0,298	0,511	0,379	0,223	0,293	0,471	0,202		0,400	-0,425	-0,213	-0,071
VEGF-C	-0,002	-0,087	0,070	0,028	0,043	-0,006	-0,035	0,400		-0,133	-0,187	-0,134
TGF- β	-0,097	0,301	0,326	-0,268	-0,011	-0,223	-0,224	-0,425	-0,133		0,593	0,628
ANGPT L4	-0,083	0,278	0,029	0,466	0,048	-0,177	0,052	-0,213	-0,187	0,593		0,025
S100 A8	0,168	0,315	0,325	-0,056	-0,217	0,205	0,061	-0,071	-0,134	0,628	0,025	
$ r \geq 0,2$ schwache Korrelation				$ r \geq 0,3$ moderate Korrelation								
$ r \geq 0,4$ starke Korrelation				$ r \geq 0,7$ sehr starke Korrelation								

Tab. 4.2 r-Werte der Pearson r-Korrelation der Zytokinwerte

	CA-125	IL6	IL10	Leptin	CCL-2	LIF	M-CSF	VEGF-A	VEGF-C	TGF- β	ANGPT L-4	S100 A8
CA-125		0,043	0,685	0,562	0,590	0,213	<0,001	0,300	0,994	0,661	0,707	0,443
IL6	0,043		0,036	0,289	0,676	<0,001	0,548	0,062	0,732	0,107	0,137	0,090
IL10	0,685	0,036		0,731	0,644	0,319	0,146	0,181	0,783	0,074	0,876	0,074
Leptin	0,562	0,289	0,731		0,583	0,148	0,835	0,443	0,912	0,253	0,038	0,815
CCL-2	0,590	0,676	0,644	0,583		0,768	0,262	0,309	0,864	0,954	0,799	0,241
LIF	0,213	<0,001	0,319	0,148	0,768		0,506	0,023	0,977	0,179	0,276	0,269
M-CSF	<0,001	0,548	0,146	0,835	0,262	0,506		0,490	0,890	0,226	0,780	0,746
VEGF-A	0,300	0,062	0,181	0,443	0,309	0,023	0,490		0,065	0,055	0,329	0,810
VEGF-C	0,994	0,732	0,783	0,912	0,864	0,977	0,890	0,065		0,528	0,351	0,596
TGF- β	0,661	0,107	0,074	0,253	0,954	0,179	0,226	0,055	0,528		<0,001	<0,001
ANGPT L-4	0,707	0,137	0,876	0,038	0,799	0,276	0,780	0,329	0,351	<0,001		0,894
S100 A8	0,443	0,090	0,074	0,815	0,241	0,269	0,746	0,810	0,596	<0,001	0,894	
* p < 0,05		*** p < 0,001										

Tab. 4.3 p-Werte der Pearson r-Korrelation der Zytokinwerte

Es konnten zwei sehr starke Korrelationen ermittelt werden. Die stärkste positive Korrelation zeigte sich zwischen IL-6 und LIF ($r = 0,802$; $***p < 0,001$). Der zweitstärkste Zusammenhang zeigte sich zwischen M-CSF und CA-125 ($r = 0,783$; $***p < 0,001$). Desweiteren ergaben sich neun starke Korrelationen: zwischen S100A8 und TGF- β ($r = 0,628$; $***p < 0,001$), ANGPTL4 und TGF- β ($r = 0,593$; $***p < 0,001$), VEGF-A und LIF ($r = 0,471$; $*p < 0,05$), ANGPTL4 und Leptin ($r = 0,466$; $*p < 0,05$) sowie IL-6 und CA-125 ($r = 0,435$; $*p < 0,05$). Eine moderate Korrelation zeigte sich zwischen IL-6 und IL-10 ($r = 0,385$; $*p < 0,05$). Alle weiteren Korrelationen zeigten keine ausreichende Signifikanz.

4.1.3 Korrelation der Zytokinspiegel mit dem BMI

Da Übergewicht einen bekannten Risikofaktor für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms darstellt, wurden die Werte der Zytokinbestimmung auch auf Korrelationen mit der Höhe des jeweiligen BMI (Body-mass-index [kg/m²]) untersucht (s. Tab. 4.4).

BMI vs.	Pearson r			P value		n
	r	95% confidence interval	R squared	P (two-tailed)	P value summary	
CA-125	-0,0838	-0,5075 to 0,3725	0,007022	0,7254	ns	20
IL-6	-0,01064	-0,4210 to 0,4033	0,0001132	0,9616	ns	23
IL-10	0,3175	-0,09856 to 0,6390	0,1008	0,1306	ns	24
Leptin	0,6554	0,2716 to 0,8593	0,4295	0,0032	**	18
CCL-2	-0,01052	-0,4122 to 0,3945	0,0001108	0,9611	ns	24
LIF	-0,1324	-0,5087 to 0,2863	0,01754	0,5373	ns	24
M-CSF	-0,1937	-0,5538 to 0,2275	0,03753	0,3644	ns	24
VEGF-A	-0,2609	-0,7261 to 0,3681	0,06806	0,4128	ns	12
VEGF-C	-0,1925	-0,6282 to 0,3352	0,03705	0,4751	ns	16
TGF-β	0,08785	-0,3271 to 0,4744	0,007717	0,6831	ns	24
ANGPT L4	0,08141	-0,3329 to 0,4694	0,006627	0,7053	ns	24
S100 A8	0,08296	-0,3315 to 0,4706	0,006882	0,7	ns	24

Tab. 4.4 Korrelation der Zytokinspiegel [pg/ml] mit dem BMI [kg/m²]

Dabei zeigte sich eine moderate Korrelation des BMIs mit IL-10 ($r = 0,318$), die aber nicht signifikant war ($p = 0,131$). Eine starke und signifikante Korrelation zeigte sich zwischen dem BMI und Leptin ($r = 0,655$; $**p < 0,005$; s. Abb. 4.2).

Darüber hinaus konnten keine weiteren signifikanten Zusammenhänge ermittelt werden.

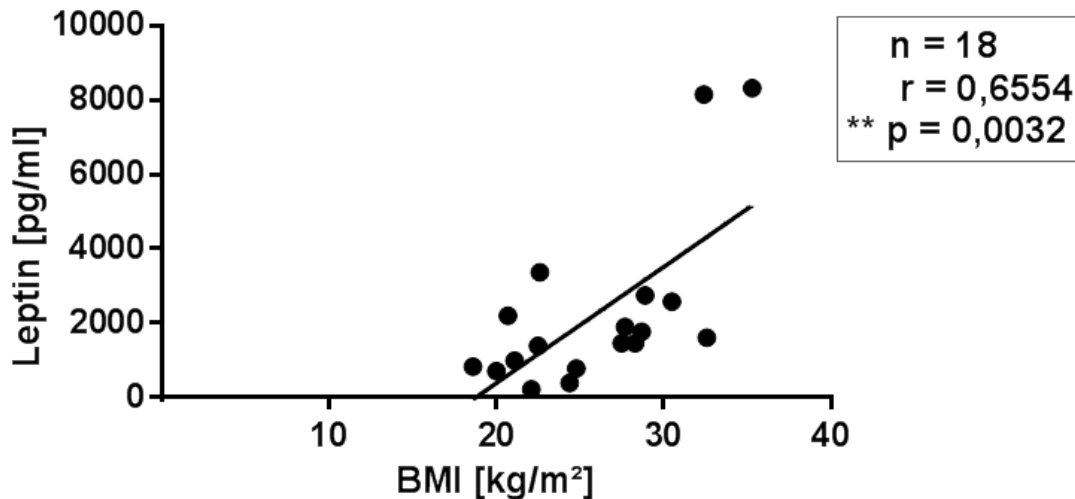


Abb. 4.2 Korrelation der Leptinkonzentration im Aszites mit dem BMI: Nicht-lineare Regression der Messwerte für Leptin mit dem errechneten BMI

4.1.4 Korrelation der Zytokinspiegel mit dem rezidivfreien Überleben

Als wichtiges Charakteristikum des Ovarialkarzinoms gilt die frühe Metastasierung nach häufig später Erstdiagnose. Mit dem Ausmaß der Metastasierung bzw. der Peritonealkarzinose sinkt auch das rezidivfreie Überleben, also die Zeit bis zum nächsten festgestellten Rezidiv nach Erstlinientherapie und damit die weitere Überlebensprognose. In dem Zusammenhang ist es von Interesse die Höhe der Zytokinspiegel im malignen Aszites in Zusammenhang mit der rezidivfreien Überlebenszeit der Patientinnen zu setzen, um eventuell prognosebestimmende Zytokine zu erkennen. Neben der Funktion als Marker könnten sie im weiteren Verlauf auch als Therapieziel genutzt werden.

Die Patientinnen wurden zu diesem Zweck im Rahmen dieser Arbeit bis zu 36 Monate beobachtet und das Auftreten eines Rezidivs registriert (Rezidivfreies Überleben = *Recurrence-free survival* = RFS).

Anschließend wurden die Patientinnen abhängig von der Höhe des Zytokinspiegels (niedrig vs. hoch) jeweils in zwei Gruppen eingeteilt. Bezüglich der Festlegung des cutoff-Wertes s. *Abschnitt 3.2.3.2 Datenauswertung*.

Anhand dieser Gruppierung und dem beobachteten Auftreten von Rezidiven wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven erstellt (s. *Abb. 4.3- 4.14*). In den Diagrammen ist jeweils die rezidivfreie Überlebenszeit (*Recurrence-free survival*, RFS) in Monaten angegeben. Striche auf der Kurve markieren zensierte Daten, die durch vorzeitiges Ausscheiden der Patienten aus der Beobachtung entstehen. Gründe hierfür können Tod oder Abbrechen der Studienmitwirkung seitens der Patientinnen sein.

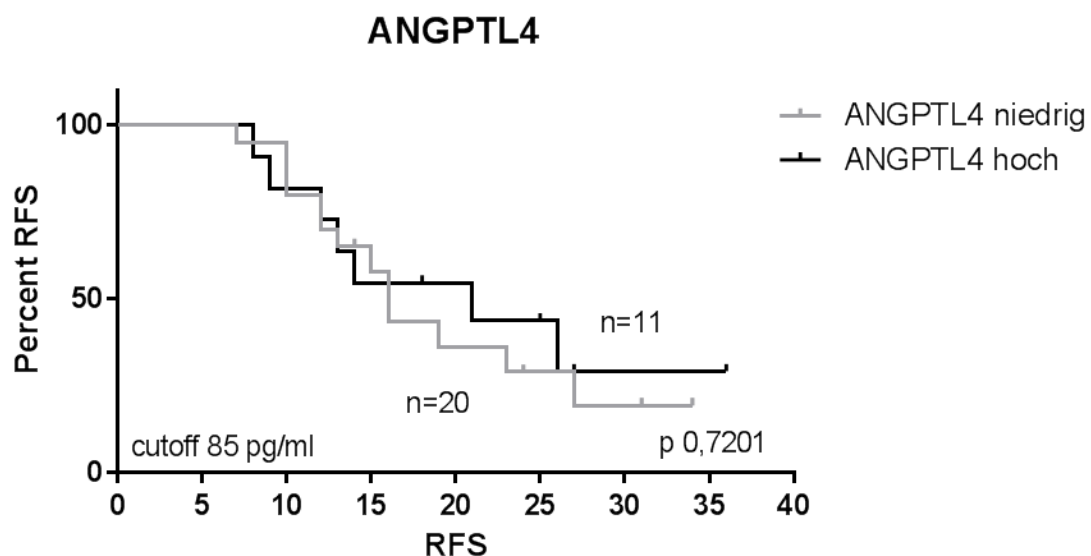


Abb. 4.3 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der ANGPTL4-Konzentration.

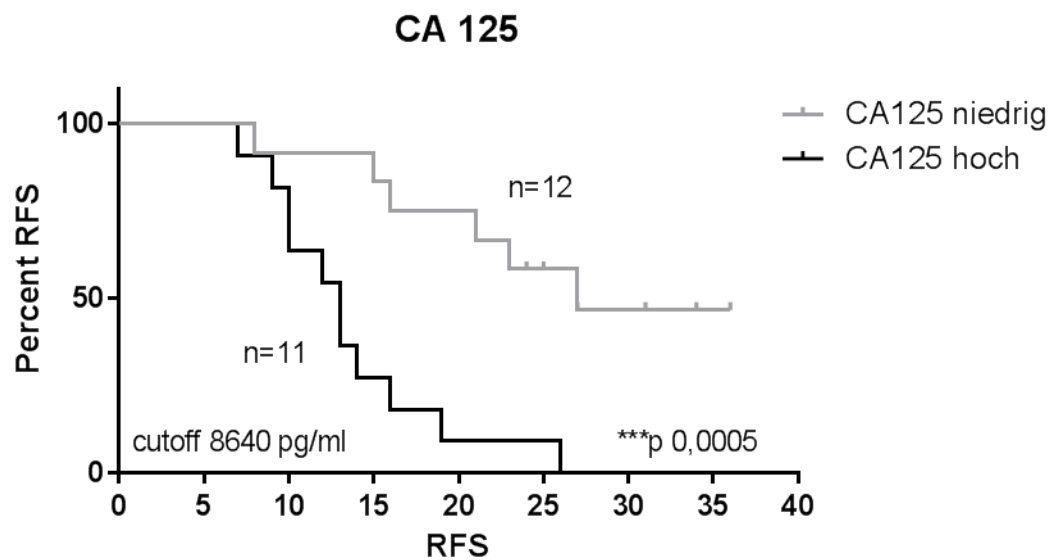


Abb. 4.4 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der CA 125-Konzentration.

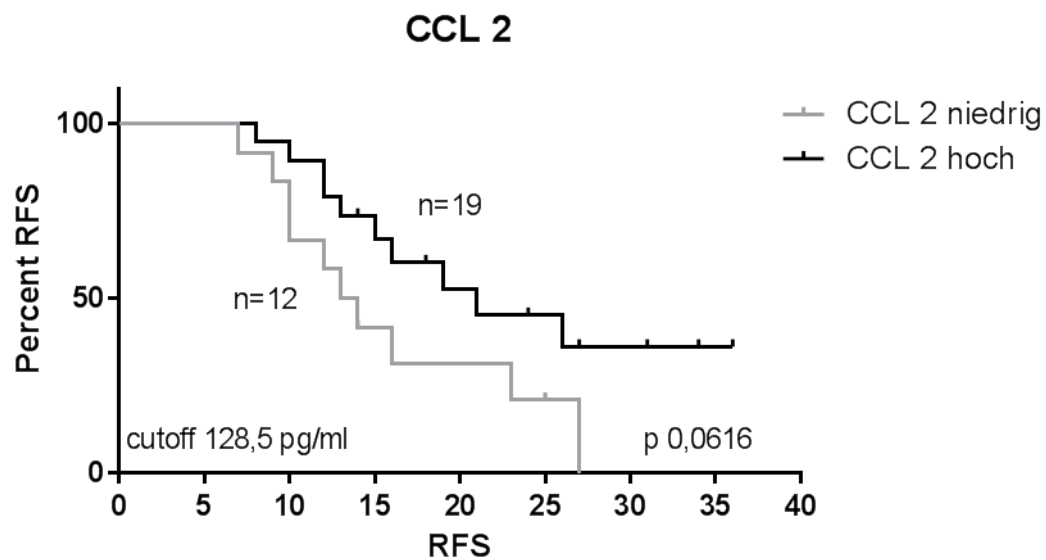


Abb. 4.5 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der CCL 2-Konzentration.

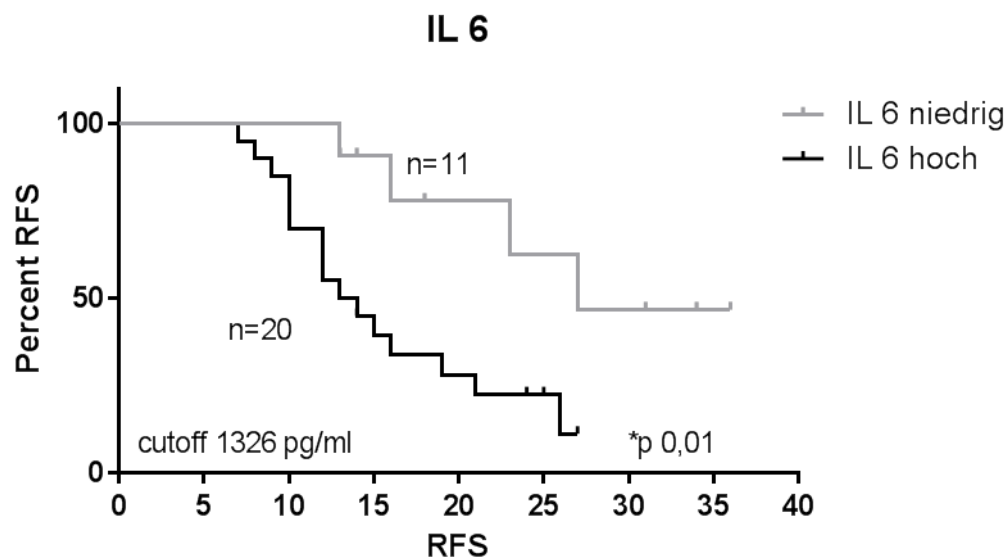


Abb. 4.6 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der IL 6-Konzentration.

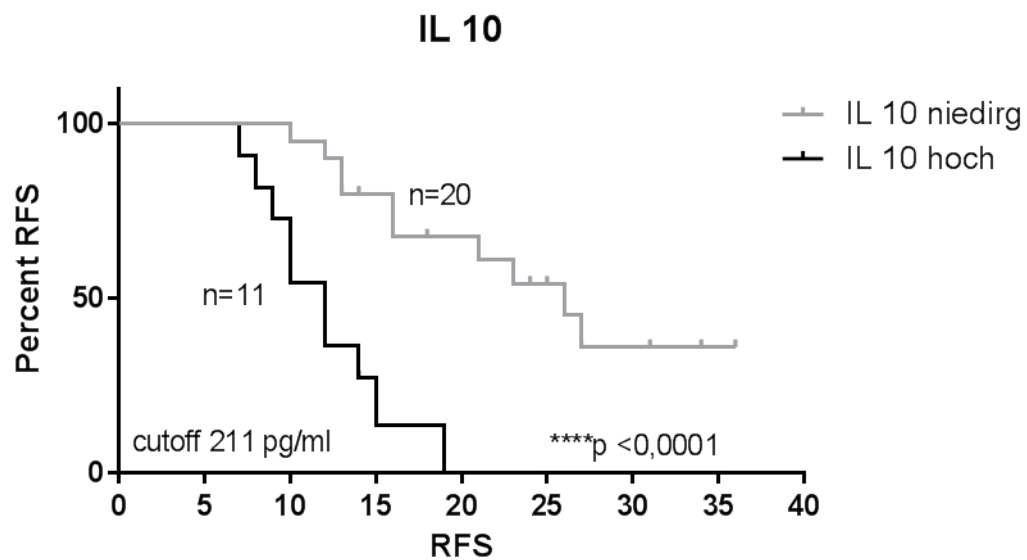


Abb. 4.7 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der IL 10-Konzentration.

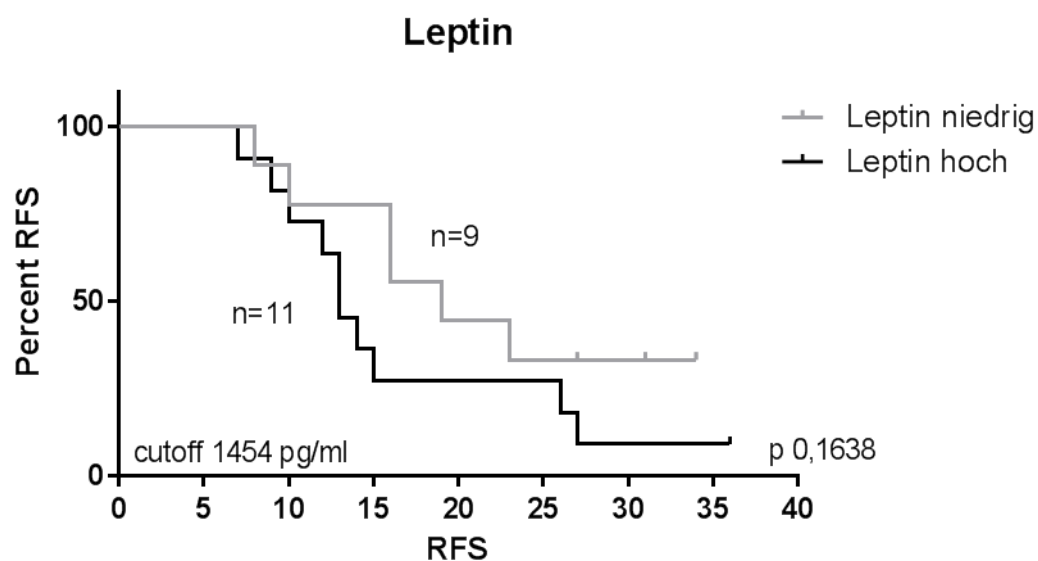


Abb. 4.8 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der Leptin-Konzentration.

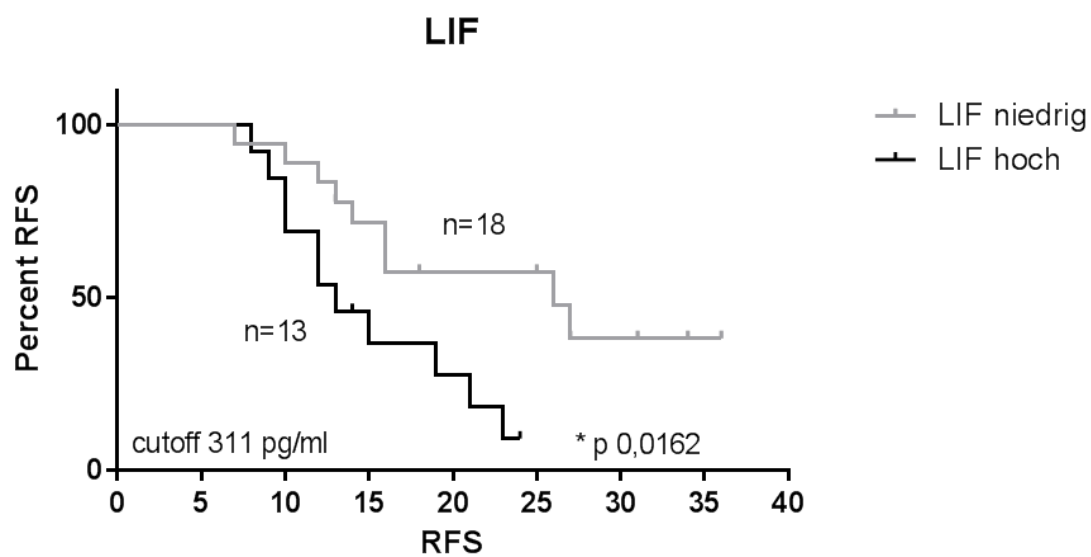


Abb. 4.9 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der ANGPTL4-Konzentration.

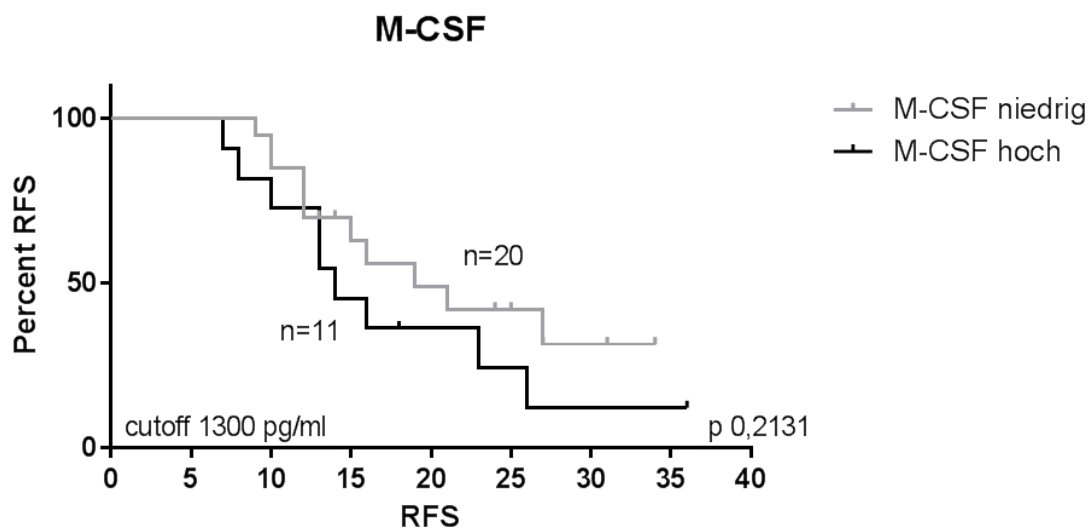


Abb. 4.10 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der M-CSF-Konzentration.

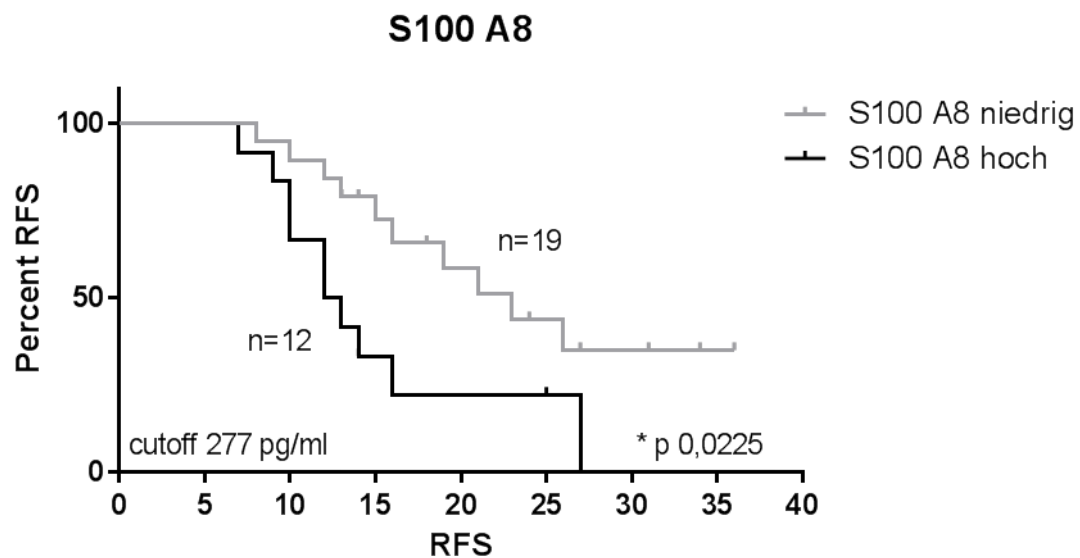


Abb. 4.11 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der S100 A8-Konzentration.

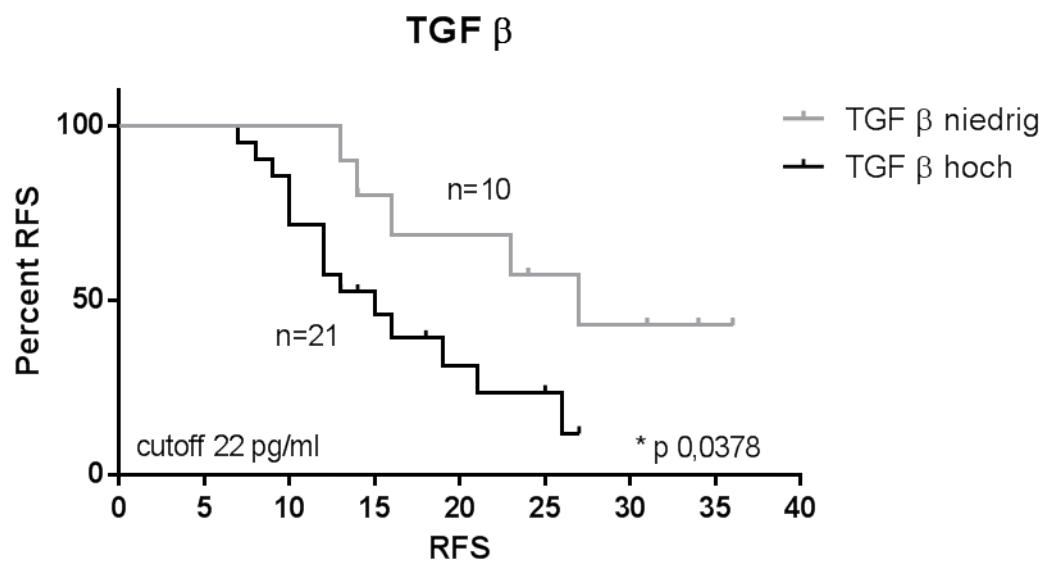


Abb. 4.12 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der TGF β -Konzentration.

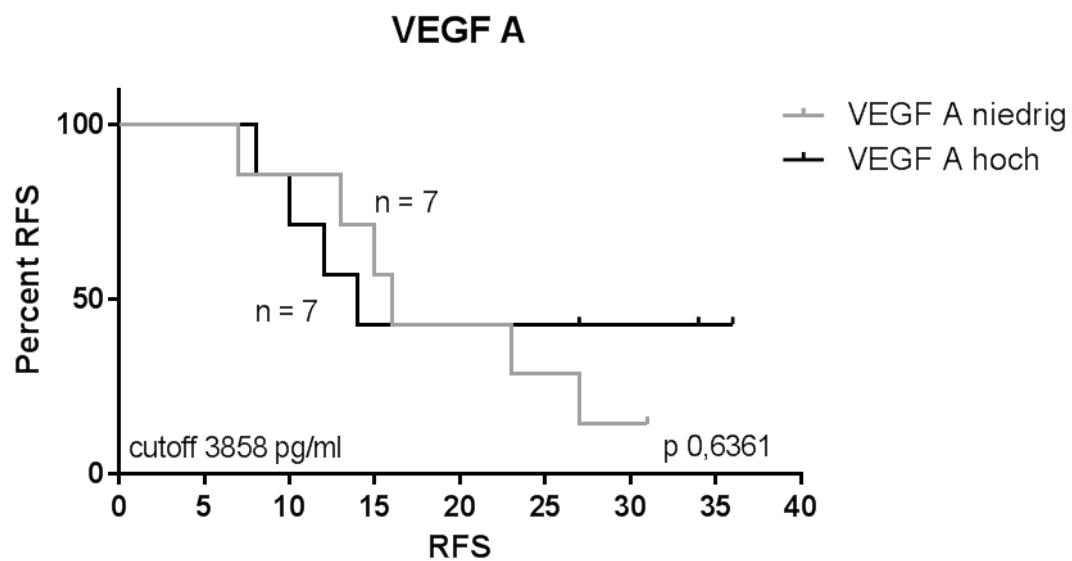


Abb. 4.13 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der VEGF A-Konzentration.

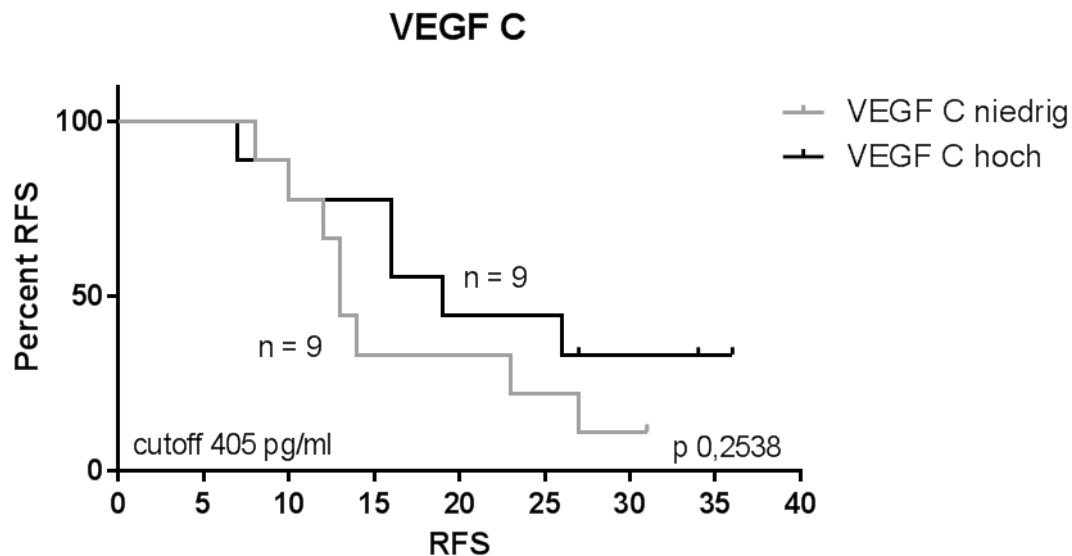


Abb. 4.14 Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit von der VEGF C-Konzentration.

Signifikante Unterschiede in der rezidivfreien Überlebenszeit der Patientinnen zwischen den als „niedrig“ bzw. „hoch“ gruppierten Zytokinwerte ergaben sich für folgende Zytokine: CA-125 (***p = 0,005), IL-6 (*p = 0,01), IL-10 (***p<0,0001), LIF (*p = 0,0162), S100 A8 (*p = 0,0225) und TGF- β (*p = 0,0378). Hier bedeutete eine als „hoch“ gruppierte Zytokinkonzentration ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben der Patientinnen.

Ein häufig verwendetes Maß für Unterschiede in der Überlebenszeit stellt das mediane Überleben dar, also der Zeitpunkt, an dem 50 % der Patienten der jeweiligen Gruppe bereits gestorben sind. Analog dazu wurde hier der Zeitpunkt, an dem 50 % der Patientinnen ein Rezidiv erlitten hatten als medianes rezidivfreies Überleben ermittelt. Als weiteres deskriptives Maß zum Vergleich der Überlebenszeiten dient das Hazard Ratio, dessen Berechnung ebenso wie die Statistik zur Signifikanz auf dem Log-rank-Test beruht. Mit dem Hazard Ratio wird in diesem Fall die Rezidivrate der beiden Gruppen miteinander verglichen (s. Tab. 4.5).

Zytokin	medianes RFS		p-Wert	Hazard Ratio	
	Zytokin "niedrig"	Zytokin "hoch"		HR ("hoch"/"niedrig")	HR 95% CI
ANGPTL 4	16	21	0,7201	0,8489	0,3438 - 2,077
CA-125	27	13	*** 0,0005	4,52	2,587 - 21,09
CCL-2	13,5	21	0,0616	0,4522	0,1537 - 1,020
IL-6	27	13,5	* 0,0101	3,631	1,380 - 7,979
IL-10	26	12	**** <0,0001	4,687	4,212 - 42,12
Leptin	19	13	0,1638	1,982	0,7683 - 5,495
LIF	26	13	* 0,0162	2,678	1,320 - 8,736
M-CSF	19	14	0,2131	1,718	0,7197 - 4,693
S100 A8	23	12,5	* 0,0225	2,589	1,220 - 8,618
TGF- β	27	15	* 0,0378	2,661	1,108 - 6,414
VEGF-A	16	14	0,6361	0,7395	0,2137 - 2,558
VEGF-C	13	19	0,2538	0,5548	0,1835 - 1,527

Tab. 4.5 Medianes rezidivfreies Überleben [Monate] und Hazard Ratio in Abhängigkeit des Zytokinspiegels. Zur Berechnung der p-Werte und des Hazard Ratios wurde jeweils der Log-rank-Test genutzt.

In den meisten Zytokinanalysen ist das mediane rezidivfreie Überleben in der Gruppe von Patientinnen mit niedrigen Zytokinspiegeln länger als in der Gruppe mit hohen Zytokinspiegeln. Hervorzuheben sind die signifikanten Unterschiede im Falle von CA-125 (27 vs. 13 Monate), IL-6 (27 vs. 13,5 Monate), IL-10 (26 vs. 12 Monate), LIF (26 vs. 13 Monate), S100 A8 (23 vs. 12,5 Monate) und TGF- β (27 vs. 15 Monate). Für die Zytokine ANGPTL 4, CCL-2 und VEGF-C gilt das Gegenteil, hier erweist sich die mediane Zeit bis zum Rezidiv in der Gruppe mit niedrigen Zytokinspiegeln als kürzer. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant.

Das Hazard Ratio verhält sich analog. Patientinnen mit hohen Spiegeln an CA-125 haben ein 4,52-fach höheres Risiko ein Rezidiv zu erleiden als solche mit niedrigen Spiegeln. Gleiches gilt für IL-6 (HR 3,63), IL-10 (HR 4,69), LIF (HR 2,68), S100 A8 (HR 2,59) und TGF- β (HR 2,66). Bei den übrigen Zytokinen lässt sich kein signifikant erhöhtes Hazard Ratio erkennen.

4.2 Einfluss von Leptin auf die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen

Die verstärkte Proliferation von Zellen ist eines der Hauptmerkmale von Tumoren. Die Aktivierung von pro-proliferativen Signalwegen wie dem STAT3- oder MAPK –Signalweg sowie anti-apoptotischen Signalwegen wie dem PI3K/AKT-Signalweg resultiert in einer verkürzten Verdopplungszeit der Zellpopulation.

Um den Einfluss von Leptin auf die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen wurden Experimente mit dem „xCELLigence RTCA DP“ System (Acea Biosciences, Bremen) durchgeführt (vgl. 3.2.2.6). Dazu wurden SKOV3-Zellen über Nacht in serumfreiem Medium unter Stimulation mit Leptin verschiedener Konzentrationen oder dem Lösungsmittel gehalten und am darauffolgenden Tag in gleicher Zellzahl nach Angaben des Herstellers als Duplikate auf Platten des Systems in serumfreiem Medium ausplattiert. Bei Start des Experimentes wurden die Zellen erneut mit Leptin bzw. dem Lösungsmittel stimuliert, nachfolgend wurden die Zellen nur noch beobachtet.

4.2.1 Analyse anhand des Zellindex

Der von der Software ermittelte Zellindex ist ein dimensionsloser Wert, der auf der gemessenen elektrischen Impedanz am Boden der Zellkulturplatte basiert. Er ist ein Maß für die zellbedeckte Fläche und Stärke der Zelladhärenz. Mithilfe des kontinuierlichen Monitoring des Zellindex ist es möglich, Veränderungen in Zelldichte und Adhärenzstärke direkt zeitabhängig zu verfolgen (s. Abb. 4.15). Um Artefakte bei der Adhärenz der Zellen auszuschließen, wurde der Zellindex mithilfe der Software auf den Zeitpunkt 1,5 Stunden nach Start des Experimentes normalisiert.

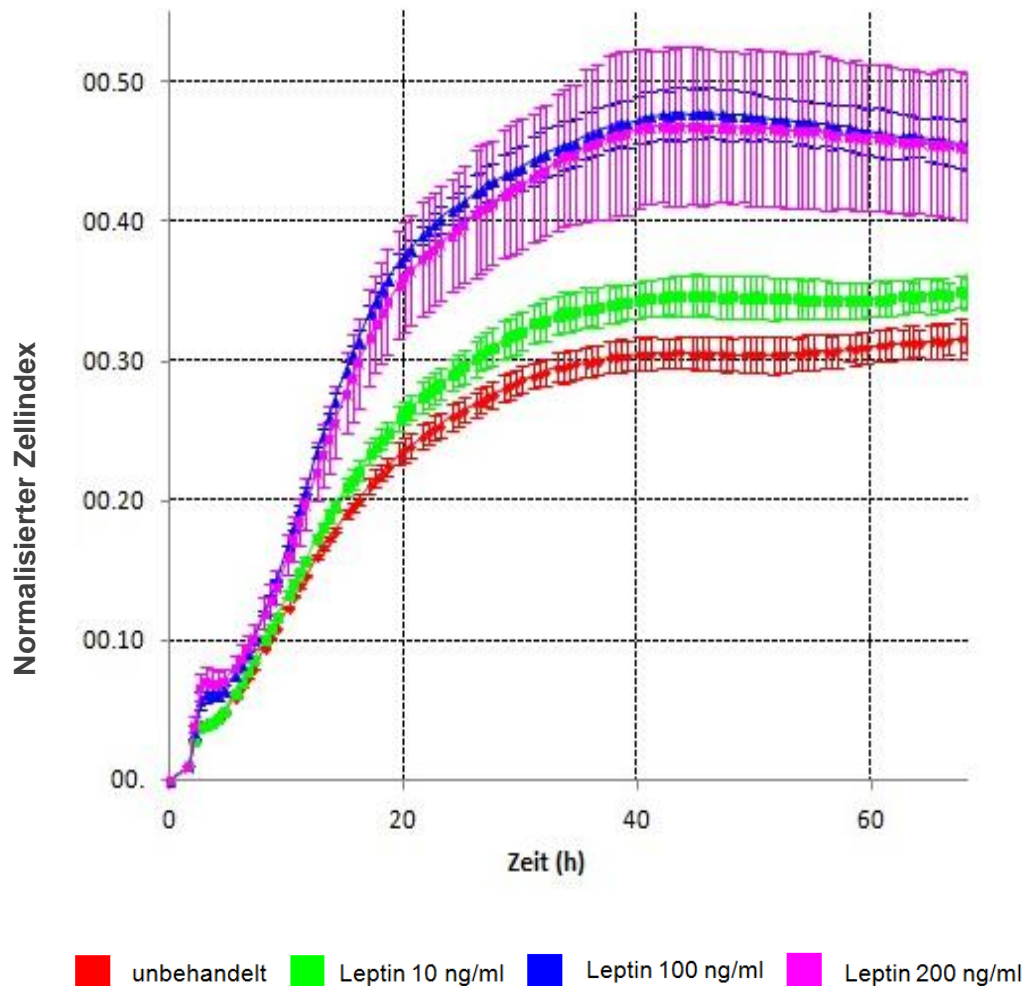


Abb. 4.15 Normalisierter Zellindexverlauf der SKOV3-Zellen unter Leptinstimulation im „xCELLigence RTCA DP“ Experiment: SKOV3-Zellen wurden serumfrei über Nacht mit Leptin (10, 100 und 200 ng/ml) bzw. dem Lösungsmittel vorinkubiert. Nach Ausplattieren auf e-Platten des „xCELLigence RTCA DP“ Systems wurde erneut auf gleiche Weise stimuliert. Anschließend wurden die Zellen nur noch beobachtet. Um Artefakte bei der Adhärenz der Zellen auszuschließen, wurde der Zellindex auf den Zeitpunkt 1,5 h nach Start des Experimentes normalisiert.

Wie Abb. 4.15 zeigt, nimmt der Zellindex abhängig von der Behandlung mit Leptin einen unterschiedlichen Verlauf. Über den gesamten Verlauf nehmen die mit Leptin stimulierten Zellen einen höheren Zellindexwert an. Dabei führt die Behandlung mit 10 ng/ml Leptin im Zeitintervall von 20 bis 60 Stunden nach Adhärenz zu einer Erhöhung des mittleren Zellindex um 13,9% (von $CI_{\text{mitt}} = 0,2896$ auf $0,3301$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung mit 100 bzw. 200 ng/ml Leptin führt im selben Zeitfenster zu einer Erhöhung des mittleren Zellindex um durchschnittlich 56,7% bzw. 53,4% (auf $CI_{\text{mitt}} = 0,4540$ bzw. $0,4444$).

Unter allen Bedingungen erreicht der Zellindex nach einer bestimmten Zeit ein Maximum. Nach diesem Zeitpunkt verhält sich der Zellindex, abgesehen von kleineren Schwankungen bis etwa 100 Stunden nach Adhärenz stabil. Im Folgenden wird der Zeitraum bis 61 h nach Adhärenz analysiert, da in diesem Zeitrahmen noch von einer vergleichbaren Proliferation mit vergleichbaren Nährbedingungen der verschieden behandelten Zellen anzunehmen ist. Im betrachteten Zeitraum tritt der Maximalwert je nach Behandlung zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt ein und nimmt einen verschiedenen Wert an. Bei den unbehandelten Zellen wird der niedrigste Maximalwert ($CI_{\text{max}} = 0,3113$) zum spätesten Zeitpunkt (60,5 h nach Adhärenz) gemessen. Unter Leptinbehandlung steigen die Maximalwerte an und treten früher ein: die Behandlung mit 10 ng/ml Leptin führt zu einem maximalen Zellindex von $0,3473$ nach 45,5 h, 100 ng/ml Leptin steigern den maximalen Zellindex weiter auf $0,4781$ nach 46 h und unter Stimulation mit 200 ng/ml Leptin wird ein maximaler Zellindex von $0,4688$ nach 44,5 h erreicht (s. *Tab. 4.6*).

Bedingung	unbehandelt	Leptin 10 ng/ml	Leptin 100 ng/ml	Leptin 200 ng/ml
Mittlerer Zellindex	0,2896	0,3301	0,4540	0,4444
STD	1,149	1,125	2,754	4,670
Relative Änderung	1	1,139	1,567	1,534
Maximalwert	0,3113	0,3473	0,4781	0,4688
Zeitpunkt	60,5 h	45,5 h	46 h	44,5 h

Tab. 4.6 Analyse des Zellindex von SKOV-3 Zellen unbehandelt und unter Leptineinfluss. Anzahl der Messungen: 64

4.2.2 Analyse anhand der Verdopplungszeit

Um die Proliferationsrate der Zellen konkret beurteilen zu können, wurde mit Hilfe der „xCELLigence RTCA DP“ – Software auf der Basis des Zellindex die Verdopplungszeit der Zellen errechnet (s. Abb.4.16).

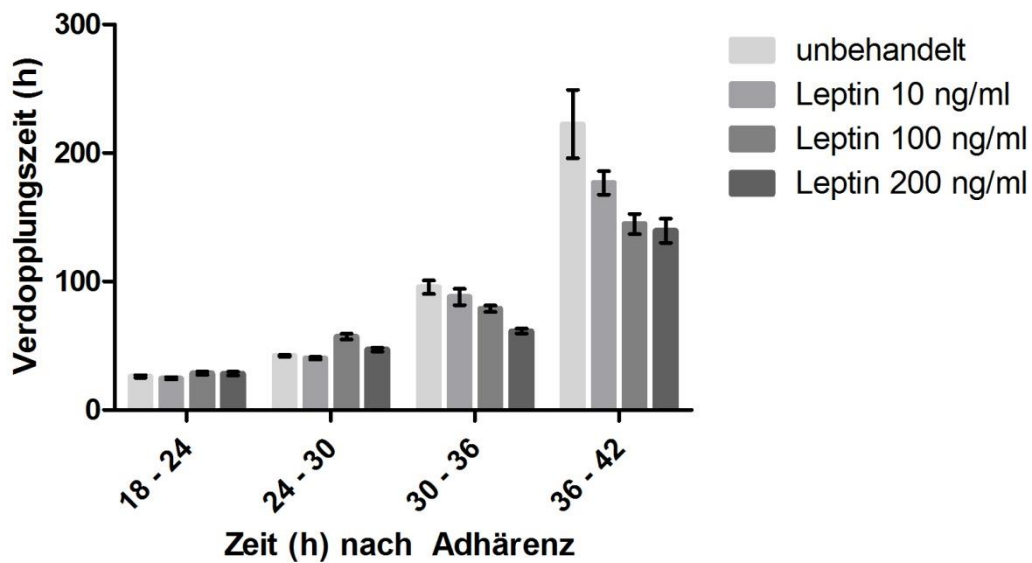


Abb. 4.16 Zeitabhängiger Verlauf der Verdopplungszeit der SKOV3-Zellen unbehandelt und unter Leptinstimulation im „xCELLigence RTCA DP“

Experiment: Auf der Basis des in Abb. 4.1 beschriebenen Zellindex wurden mit der zugehörigen Software die Verdopplungszeiten in den Zeitintervallen 18 bis 24, 24 bis 30, 30 bis 36 sowie 36 bis 42 Stunden nach Adhärenz der Zellen errechnet.

Die Zellen weisen zu Beginn - im Zeitfenster von 18 bis 24 Stunden nach Adhärenz - keine wesentlichen Unterschiede in ihrer Verdopplungszeit auf. 24 bis 30 Stunden nach Adhärenz zeigen die mit Leptin behandelten Zellen unterschiedliche Reaktionen. Die mit 10 ng / ml Leptin behandelten Zellen zeigen keine bedeutsamen Änderungen der Proliferationsgeschwindigkeit gegenüber den unbehandelten Zellen (Verkürzung der Verdopplungszeit um etwa 4,5%). Die Zellen, die mit 100 bzw. 200 ng / ml Leptin stimuliert wurden, zeigen zunächst eine Erhöhung der Verdopplungszeit um 35 % bzw. 11 % im Vergleich mit den unbehandelten Zellen. Im Zeitintervall von 30 bis 36 Stunden nach Adhärenz verkürzt sich die Verdopplungszeit jedoch um 7,8 % (10 ng / ml Leptin), 17,5 % (100 ng/ml Leptin) bzw. 35,6 % (200 ng/ml Leptin). Nach 36 Stunden Adhärenz sinkt die Verdopplungszeit um 20,5 % (10 ng / ml Leptin), 34,9 % (100 ng/ml Leptin) bzw. 37,3 % (200 ng/ml Leptin) im Vergleich mit den unbehandelten Zellen.

4.3 Charakterisierung der Signalwege von Leptin in Ovarialkarzinomzelllinien

Um den Effekt von Leptin auf Ovarialkarzinomzellen zu verstehen und eine gezielte Therapie entwickeln zu können, ist es notwendig den vermittelnden Signalweg zu kennen. In der Literatur sind verschiedene Signalwege beschrieben, durch die Leptin wirkt. Um dies mit unseren Zellen zu verifizieren wurden die Ovarialkarzinomzelllinien BG-1, SKOV-3 und hinsichtlich der Etablierung des Angiogenesemodells mit HUVEC auch diese humanen Primärzellen auf den Signalweg untersucht. Insbesondere der MAPK-Signalweg, der STAT3-Signalweg und der AKT-Signalweg werden häufig in der Literatur als vermittelnde Signalwege genannt, sodass diese Signalwege im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der Induktion durch Leptin untersucht wurden.

4.3.1 Die Rolle des MAPK-Signalwegs in der Signaltransduktion von Leptin

Der MAPK-Signalweg („Mitogen-activated protein kinase“) beruht auf einer Kaskade hintereinander geschalteter Kinasen und stellt ein weitverbreitetes Signaltransduktionsprinzip dar. Er reguliert bei Stimulation durch Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Mitogenen oder Stresssignalen durch Induktion oder Repression der Genexpression verschiedene essentielle Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Klassischerweise besteht die Kaskade aus drei hintereinander geschalteten Serin/Tyrosin-Threonin-Kinasen, die sich jeweils durch Phosphorylierung aktivieren. Die MAP-Kinasen, die am Ende des klassischen dreistufigen Signalwegs stehen, können in drei Gruppen eingeteilt werden, die sich jeweils in ihrem aktivierenden Stimulus unterscheiden. Dazu zählen die JNK („c-Jun-N-terminalen Kinasen“), die p38-MAPK und ERK („extracellular signal-regulated kinases“) mit den Isoformen 1

und 2, die überwiegend von Mitogenen aktiviert werden. Die Bindung von Wachstumsfaktoren an den Rezeptor löst dann die Kaskade Ras - Raf – MEK 1/2 - ERK 1/2 aus. ERK 1 und 2 akkumulieren im Nukleus und aktivieren Transkriptionsfaktoren. Dies führt hauptsächlich zu Zellproliferation, Zellwachstum und Differenzierung. Diese Signalkaskade ist in 30 % aller Tumoren konstitutiv aktiv (Pearson et al., 2001). Im Ovarialkarzinom ist eine Dysregulation dieses Signalwegs im Zusammenhang mit der Entwicklung von Chemoresistenz beschrieben (Sheppard et al., 2013).

Um die basale Aktivität des MAPK-Signalwegs und seine Stimulation durch Leptin zu untersuchen, wurden Ovarialkarzinomzellen unbehandelt und behandelt auf ihre Menge an aktiviertem ERK 1/2 untersucht.

Dazu wurden SKOV3-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Leptin (10, 50, 100 oder 200 ng/ml) behandelt und anschließend immunologisch die Menge an pERK 1/2 gemessen (s. Abb. 4.17).

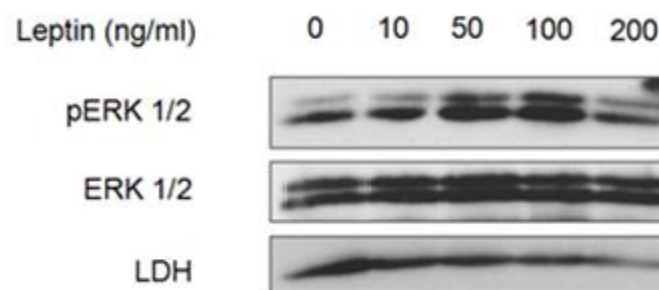


Abb. 4.17 Aktivierung von ERK 1/2 in SKOV3-Zellen unter Leptinstimulation: SKOV3-Zellen wurden mit Leptin (10, 50, 100 oder 200 ng/ml) 30 min. behandelt. Anschließend wurde ERK 1/2 sowie pERK 1/2 mittels Western Blot nachgewiesen. LDH dient der Ladekontrolle

Die Behandlung mit Leptin über 30 Minuten führt bis zu einer Dosis von 100 ng/ml zu einer dosisabhängig verstärkten Phosphorylierung von ERK 1/2. Dieser Effekt ist bei der Konzentration von 200 ng/ml Leptin nicht mehr zu beobachten.

4.3.2 Die Rolle des PI3K/AKT-Signalwegs in der Signaltransduktion von Leptin

Der PI3K/AKT-Signalweg vermittelt insbesondere Signale, die eine verstärkte Zellproliferation und Inhibition der Apoptose bewirken. Bei Bindung von Wachstumsfaktoren u.ä. an den jeweiligen Rezeptor wird durch Rezeptor-Tyrosinkinasen die Kinase PI3K („Phosphoinositid-3-Kinase“) aktiviert, die wiederum PIP2 („Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat“) zu PIP3 („Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat“) phosphoryliert. PIP3 wiederum ist in der Lage die Proteinkinase B (PKB/AKT) zu aktivieren. Die Aktivierung von AKT wirkt u.a. anti-apoptotisch durch Inhibition von proapoptotischen Proteinen der BCL-2-Familie sowie indirekt proliferativ durch Hemmung von Zellzyklus-inhibierenden Proteine aus der Familie der CDK-Inhibitoren (p21 und p27). In vielen Karzinomen ist dieser Signalweg dysreguliert. Im Fall des Ovarialkarzinoms ist bekannt, dass eine Mutation von AKT zu einer konstitutiven Aktivierung führt (Hanrahan et al., 2012). Um die intrazellulären Effekte von Leptin auf Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen, wurde anhand von BG1-Ovarialkarzinomzellen das Ausmaß der AKT Phosphorylierung bestimmt. Dazu wurden BG1-Zellen nach Ermittlung einer geeigneten Dosis mit Leptin (50 ng/ml) behandelt und nach 10, 15, 20 und 25 Minuten pAKT 1/2/3 detektiert (s. Abb. 4.18).

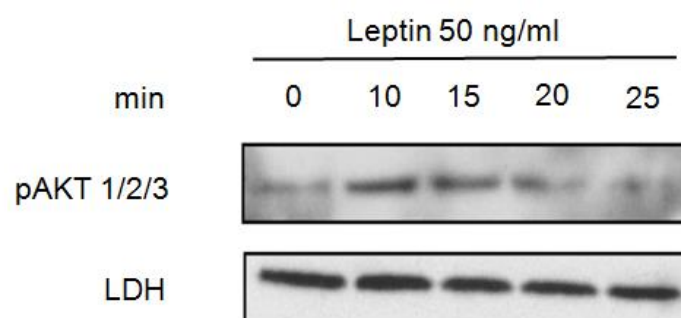


Abb. 4.18 Zeitabhängige Leptin-induzierte AKT-Aktivierung in BG1-Zellen: Die Zellen wurden für 0, 10, 15, 20 und 25 Minuten mit 50 ng/ml Leptin bzw. dem Lösungsmittel behandelt. Anschließend wurden mit Western Blots entsprechende Proteine nachgewiesen. LDH dient der Ladekontrolle

Die behandelten Zellen weisen eine verstärkte Phosphorylierung von AKT 1/2/3 auf. Diese ist nach 10 Minuten am stärksten ausgeprägt und klingt anschließend wieder ab bis sie nach 25 Minuten nicht länger nachweisbar ist.

4.3.3 Die Rolle des STAT3-Signalwegs in der Signaltransduktion von Leptin

Von den Zytokinen IL-6, IL-10 und LIF ist bekannt, dass sie ihren Effekt insbesondere über den STAT3-Signalweg („Signal transducer and activator of transcription 3“) vermitteln. Die zytoplasmatischen Proteine der STAT-Familie werden bei Rezeptorbindung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren von Kinasen phosphoryliert. Durch Aktivierung der rezeptorassoziierten Kinase JAK2 (Janus Kinase-2) wird STAT3 überwiegend an Tyrosin 705 phosphoryliert, während eine Aktivierung von ERK/MAPK überwiegend in einer Phosphorylierung an Serin 727 resultiert. Nach der Aktivierung homo- oder heterodimerisieren die STAT3-Moleküle und translozieren in den Kern, wo sie die Transkription pro-proliferativ und anti-apoptotisch wirkender Gene induzieren.

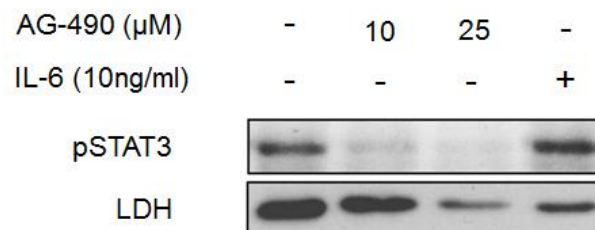
In vielen Karzinomen findet sich eine konstitutive Aktivierung des STAT3-Signalweges (Klampfer, 2002). In Arbeiten von Liu et al. resultierte die Blockade des STAT3-Signalweges in Ovarialkarzinomzellen in einer Inhibition der Proliferation durch Zellzyklusarrest und Induktion von Apoptose (Liu et al. 2014). Es konnte nachgewiesen werden, dass in chemoresistenten Ovarialkarzinomzellen eine Überaktivität von STAT3 eine Rolle spielt. Diese Zellen konnten durch STAT3-Silencing erneut sensibel gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika gemacht werden (Han et al., 2013). Es wurde berichtet, dass Leptin seinen Effekt auf Ovarialkarzinomzellen ebenfalls über eine STAT3-Aktivierung vermittelt. Die untersuchten Zellen waren hierbei BG-1 Zellen (Choi et al., 2005 und 2010) sowie OVCAR-3 (Ptak et al., 2013).

4.3.3.1 Spezifität des anti-pSTAT3-Antikörpers

Um falsch positive Ergebnisse bei der Detektion von pSTAT3 weitgehend auszuschließen, wurde der verwendete anti-pSTAT3-Antikörper auf seine Spezifität getestet.

Dazu wurden HUVEC über Nacht mit dem JAK2-Inhibitor AG-490 (10 und 25 μ M) inkubiert bzw. am darauffolgenden Tag für 30 Minuten mit IL-6 (10 ng/ml) stimuliert (s. Abb. 4.19a). Des Weiteren wurden Makrophagen über Nacht mit einem anti-IL-6-Antikörper (500 ng/ml) vorinkubiert bzw. am nächsten Tag für 30 Minuten mit IL-6 (10 ng/ml) stimuliert (s. Abb. 4.19b). Die Zelllysate wurden anschließend mittels Western Blot auf ihren pSTAT3-Gehalt untersucht. Die Kontrolle mittels Makrophagen eignet sich, da diese auf Stimulation mit IL-6 mit einer sehr starken Induktion von STAT3 reagieren.

a)



b)

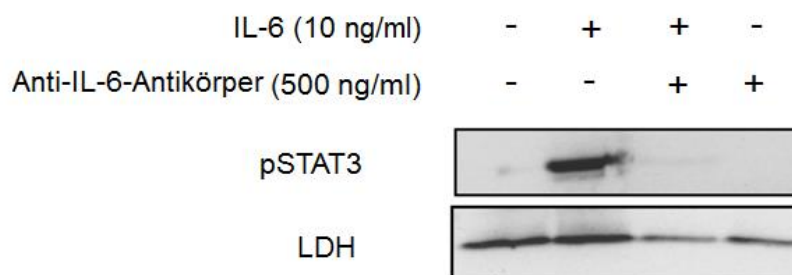


Abb. 4.19 Spezifität des anti-pSTAT3-Antikörpers: a) HUVEC wurden über Nacht mit AG-490 (10 und 25 μ M) vorinkubiert und am darauffolgenden Tag 30 min mit IL-6 (10 ng/ml) behandelt b) Makrophagen wurden wie angegeben o/n mit einem anti-IL-6-Antikörper (500 ng/ml) inkubiert und am nächsten Tag für 30 min mit IL-6 (10 ng/ml) behandelt.

In Übereinstimmung mit der Literatur ist die Phosphorylierung von STAT3 hauptsächlich auf die Aktivität der JAK2 zurückzuführen (z.B. Xu et al., 2015; Cheppudira et al., 2015). Der basal detektierbare Level an pSTAT3 ist mit AG-490 in HUVEC vollständig supprimierbar, wohingegen in IL-6 behandelten HUVEC eine erhöhte Menge an pSTAT3 detektierbar ist. Auch in den Makrophagen führt die Stimulation mit IL-6 zu einem erhöhten Level von pSTAT3, der unter Vorbehandlung mit dem anti-IL-6-Antikörper nicht länger detektierbar ist. Die Sensitivität des anti-pSTAT3-Antikörpers wurde in allen Experimenten mittels einer mit IL-6 behandelten Probe als Positiv-Kontrolle getestet.

4.3.3.2 Einfluss von Leptin auf die STAT3-Aktivierung in BG1-Zellen

BG1-Zellen wurden für 30 Minuten mit Leptin verschiedener Konzentration (10, 50, 100 und 200 ng/ml) oder IL-6 (10 ng/ml) bzw. den Lösungsmitteln behandelt und anschließend phosphoryliertes STAT3 nachgewiesen (s. Abb. 4.20).

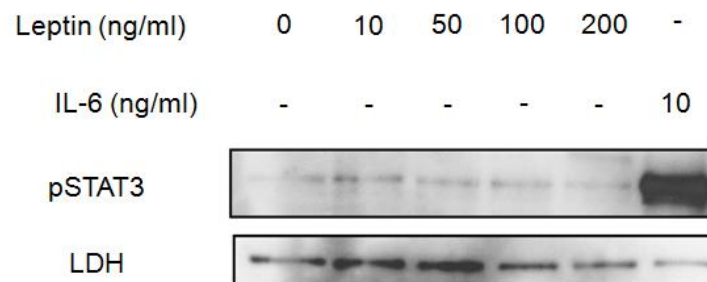


Abb. 4.20 Leptin- bzw. IL-6-induzierte STAT3-Aktivierung in BG1-Zellen: Die Zellen wurden für 30 min mit Leptin (10, 50, 100 oder 200 ng/ml) oder IL-6 (10 ng/ml) bzw. den Lösungsmitteln behandelt. Anschließend wurden mit Western Blots entsprechende Proteine nachgewiesen. LDH dient der Ladekontrolle

Im unbehandelten Zustand ist in den BG1-Zellen kaum phosphoryliertes STAT3 nachweisbar. Die Behandlung mit IL-6 führt zu einem deutlichen Anstieg der Menge an phosphoryliertem STAT3 im Zelllysat. Unter Stimulation mit Leptin

kommt es bei keiner der eingesetzten Konzentrationen zu einer Erhöhung der Menge von phosphoryliertem STAT3.

4.3.3.3 Einfluss von Leptin auf die STAT3-Aktivierung in SKOV3-Zellen

Um die Aktivierung des STAT3-Signalweges durch Leptin in einer weiteren Ovarialkarzinomzelllinie zu untersuchen, wurden SKOV3-Zellen für 30 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von Leptin (10, 50, 100 oder 200 ng/ml) oder IL-6 (10 ng/ml) als Positiv-Kontrolle bzw. den Lösungsmitteln behandelt (s. Abb. 4.21).

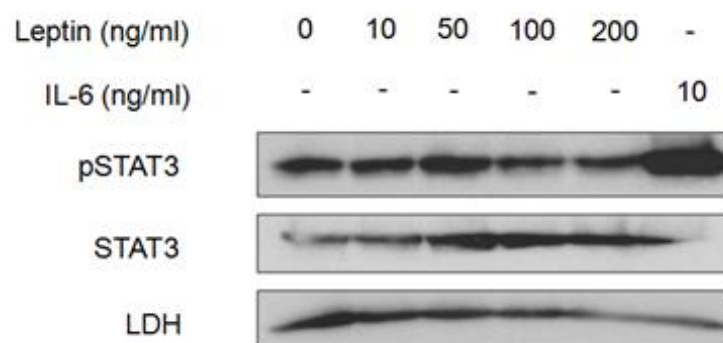


Abb. 4.21 Dosisabhängige STAT3-Aktivierung in SKOV3-Zellen unter Leptinstimulation: Die Zellen wurden für 30 min mit Leptin (10, 50, 100 oder 200 ng/ml) oder IL-6 (10ng/ml) bzw. den Lösungsmitteln behandelt. Anschließend wurden mit Western Blots entsprechende Proteine im Zelllysate nachgewiesen.

Die Behandlung mit Leptin führt unabhängig von der Dosis zu keiner nennenswerten Zunahme der pSTAT3-Proteine, wohingegen IL-6 eine deutliche Aktivierung des STAT3-Signalweges zeigt.

Um auszuschließen, dass die Phosphorylierung von STAT3 nach 30 Minuten bereits wieder abgeklungen ist, wurde eine Kinetik von einer Stimulation der SKOV3-Zellen mit 200 ng/ml Leptin durchgeführt. Dazu wurden die STAT3-Phosphorylierung in den Zellen zu den Zeitpunkten 5, 10, 15, 20 und 25 Minuten nach Stimulation untersucht (s. Abb. 4.22).

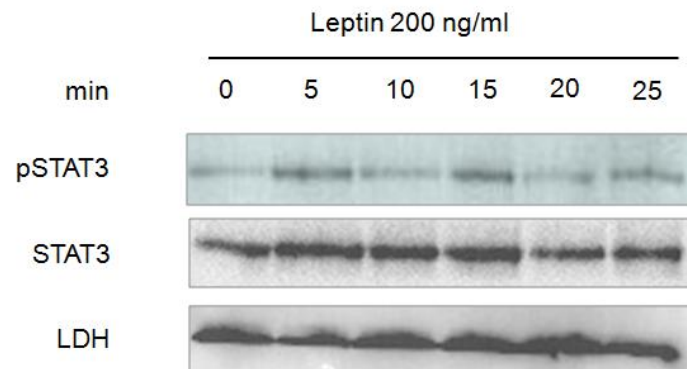


Abb. 4.22 Zeitabhängige STAT3-Aktivierung in SKOV3-Zellen unter Leptinstimulation: Die Zellen wurden für 5, 10, 15, 20 oder 25 Minuten mit 200 ng/ml Leptin bzw. nur mit dem Lösungsmittel behandelt. Anschließend wurden mit Western Blots entsprechende Proteine im Zelllysate nachgewiesen.

Um einen möglichen Effekt von Leptin auf den STAT3-Signalweg in SKOV3-Zellen nachzuweisen, der auf Proteinebene nicht detektierbar ist, wurden verschiedene bekannte Zielgene des STAT3-Signalweges mittels qPCR analysiert. Dazu wurden SKOV3-Zellen eine Stunde lang mit Leptin (10, 50, 100 und 200 ng/ml) behandelt und anschließend mittels qPCR die relative Expression von SOCS3, normalisiert auf das Haushaltsgen L27, bestimmt (s. Abb. 4.23).

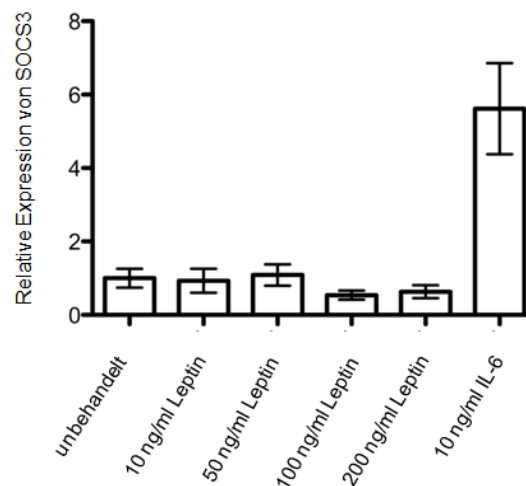


Abb. 4.23 STAT3-Zielgenexpression in SKOV3-Zellen unter Leptinstimulation: Zellen wurden für 1 h behandelt, anschließend wurde eine qPCR zur Bestimmung der relativen Expression von SOCS3 durchgeführt. Normalisierung auf L27, einem Haushaltsgen in SKOV3-Zellen. Durchführung als technisches Triplikat, Darstellung mit entsprechender Standardabweichung.

Die Behandlung mit Leptin führt dosisunabhängig zu keiner erhöhten Expression des typischen Zielgens des STAT3-Signalweges und zeigt damit auch auf mRNA-Ebene keine Aktivierung des untersuchten Signaltransduktionsmechanismus.

4.3.3.4 Einfluss von Leptin auf die STAT3-Aktivierung in HUVEC

Für die Etablierung eines Angiogenese-Modell anhand des „BD Matrigel“ wurden HUVEC genutzt. Von HUVEC wurde berichtet, dass sie ebenfalls Leptinrezeptoren exprimieren (Ferla et al., 2011). Da dieses Modell für Versuche mit HUVEC unter dem Einfluss von Leptin entwickelt werden sollte, wurde auch hier versucht den vermittelnden Signalweg zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden leptinbehandelte Zellen (200 ng/ml Leptin) auf ihre STAT3-Aktivität hin untersucht (s. Abb. 4.24).

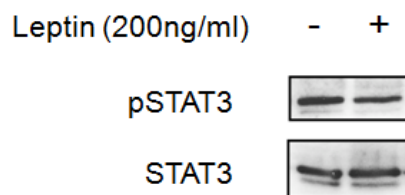


Abb. 4.24 STAT3-Aktivierung in HUVEC unter Leptinstimulation: HUVEC wurden für 30 min mit 200 ng/ml Leptin behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot STAT3 und pSTAT3 detektiert.

HUVEC zeigen unter der Leptinbehandlung auf Proteinebene keine verstärkte STAT3-Aktivität, welche durch IL-6 hingegen auslösbar ist (vgl. Abb. 4.8a). Um eine etwaige Regulation auf mRNA-Ebene zu erfassen, wurde mit auf gleiche Weise stimulierten Zellen eine qPCR durchgeführt. Dabei wurde die relative Expression von zwei Zielgenen von STAT3 (MCP-1 und SOCS3) ermittelt (s. Abb. 4.25).

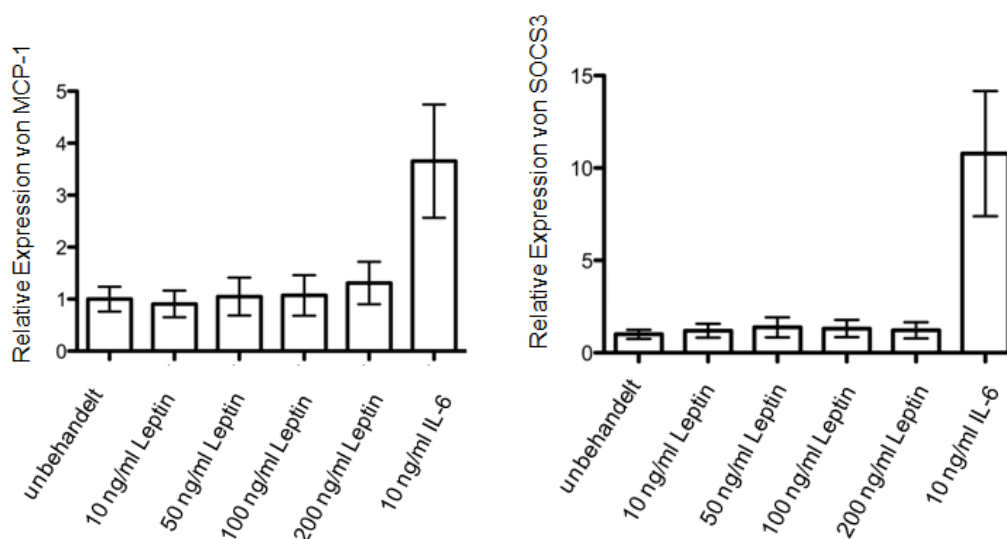


Abb. 4.25 STAT3-Zielgenexpression in HUVEC unter Leptinstimulation: Zellen wurden für 1 h behandelt, anschließend wurde eine qPCR zur Bestimmung der relativen Expression von MCP1 und SOCS3 durchgeführt. Normalisierung auf L27, einem Haushaltsgen in HUVEC. Durchführung als technisches Triplikat, Darstellung mit entsprechender Standardabweichung.

Die relative Expression der STAT3-Zielgene wird durch Leptin nicht erhöht. Die Behandlung mit IL-6 führt erwartungsgemäß und in Übereinstimmung mit den Untersuchungen auf Proteinebene zu einer deutlichen Hochregulation der Transkription von STAT3-Zielgenen.

Um auszuschließen, dass die basale Aktivität von STAT3 bereits ein so hohes Maß hat, dass eine Steigerung durch Leptin nicht nachweisbar ist, wurden die Zellen über Nacht mit einem anti-IL-6-Antikörper oder einem anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper (Tocilizumab) vorinkubiert und am darauffolgenden Tag mit 200 ng/ml Leptin bzw. dem Lösungsmittel stimuliert (s. Abb. 4.26).

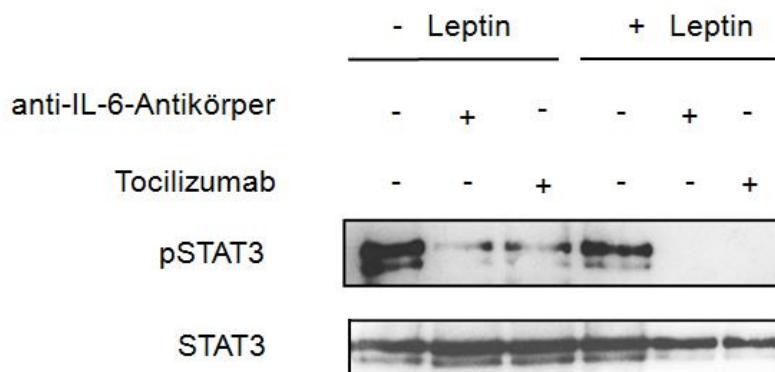


Abb. 4.26 Hemmung der basalen STAT3-Aktivität in HUVEC durch IL-6-Antagonisten: HUVEC wurden o/n mit einem anti-IL-6-Antikörper oder Tocilizumab (anti-IL-6-R-Antikörper) vorinkubiert und am Folgetag 30 min mit 200 ng/ml Leptin behandelt

Die Zellen weisen nach Behandlung mit den IL-6-Antagonisten kaum noch basales pSTAT3 auf. Die Aktivierung von STAT3 lässt sich dennoch nach zusätzlicher Leptinbehandlung nicht nachweisen.

4.4 Etablierung eines Angiogenesemodells („BD Matrigel“)

Da die Angiogenese ein essentieller Faktor in der Tumorgenese ist, wurde angestrebt anhand der Netzbildung von HUVEC auf „BD Matrigel“ ein geeignetes Angiogenesemodell zu etablieren (vgl. 3.2.2.5 Angiogenese-Assay). Anschließend sollte das Verhalten von HUVEC in dem Angiogenesemodell in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Kulturmediums untersucht werden. Die Ergebnisse sollten dann ermöglichen den angiogenetischen Effekt von Leptin zu untersuchen.

FCS und andere Wachstumsfaktoren fördern die Proliferation, was sich negativ auf die Netzbildung auswirken kann. Um die Effekte von Stimulantien bestmöglich untersuchen zu können wurden zunächst verschiedene Bedingungen ausgetestet.

Das „BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix“ enthält neben den Matrixproteinen Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglykane und Entactin/Nidogen alle Wachstumsfaktoren, die natürlicherweise im Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Sarkom der Maus vorkommen, einschließlich TGF- β , EGF, IGF, FGF und t-PA.

Die HUVEC wurden im Duplikat zum einen im üblichen EGM-2 Medium mit 2 % FCS (Vollmedium) und Wachstumsfaktoren, als auch in einem reduzierten EGM-2 Medium ohne hEGF, hFGF-b, VEGF und IGF-1 mit Zusatz von 0,5% FCS (im Folgenden EBM-2* genannt) auf das „Matrigel“ ausplattiert. Die gebildeten Strukturen wurden 24 und 48 Stunden später fotografiert (s. Abb. 4.27 und 4.28). Versuche ohne Zusatz von FCS im Medium hatten eine insuffiziente Adhärenz mit Absterben der Zellen zur Folge, weswegen der Zusatz von 0,5% FCS beibehalten wurde.

Sowohl in dem wachstumsfaktorreduzierten Medium als auch in dem Vollmedium bilden sich 24 Stunden nach Aussaat die typischen Netzwerke. Die Qualität der Netzbildung unterscheidet sich jedoch in Abhängigkeit vom Medium. Um die Effizienz der Netzbildung zu objektivieren wurde die Zahl

der Tubuli, also der umschlossenen Bereiche, sowie die Anzahl der Verzweigungen in einem für das gesamte Feld repräsentative Blickfeld in beiden Replikaten bestimmt. Im wachstumsfaktorreduzierten Medium ergeben sich $19 (\pm 1)$ im Vergleich zu $24 (\pm 2)$ Tubuli im Vollmedium. Die Anzahl an Verzweigungen beträgt im wachstumsfaktorreduzierten Medium $16,5 (\pm 1,5)$ gegenüber $30 (\pm 5)$ im Vollmedium. Im Vollmedium ergeben sich insgesamt stabilere Netzwerke, die aus annähernd rundlichen Tubuli im Vergleich zu den polygonalen Tubuli im wachstumsfaktorreduzierten Medium bestehen.

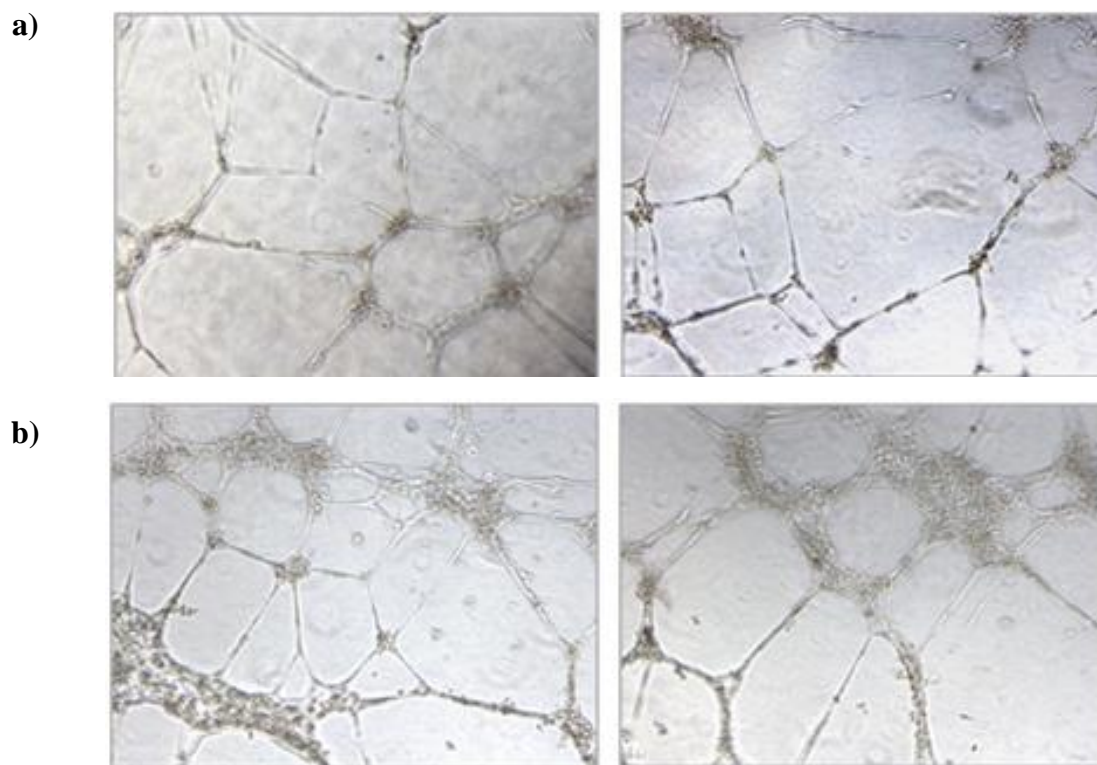


Abb. 4.27 HUVEC auf „BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix“ nach 24 Stunden: a) HUVEC in EBM-2* b) HUVEC in EGM-2 (2%FCS). 5x Vergrößerung

Weitere 24 Stunden später fangen die Netzwerke unter beiden Bedingungen an sich zurückzubilden. Die Degradierung der Netzwerke geht mit einer Verringerung der Anzahl der Tubuli und Verzweigungen einher. Im wachstumsfaktorreduzierten Medium finden sich noch $13,5 (\pm 0,5)$ im Vergleich

zu $20,5 (\pm 2,5)$ Tubuli im Vollmedium. Die Anzahl der Verzweigungen geht im wachstumsfaktorreduzierten Medium auf $13 (\pm 1)$ und im Vollmedium auf $17 (\pm 0)$ zurück (s. Abb. 4.28).

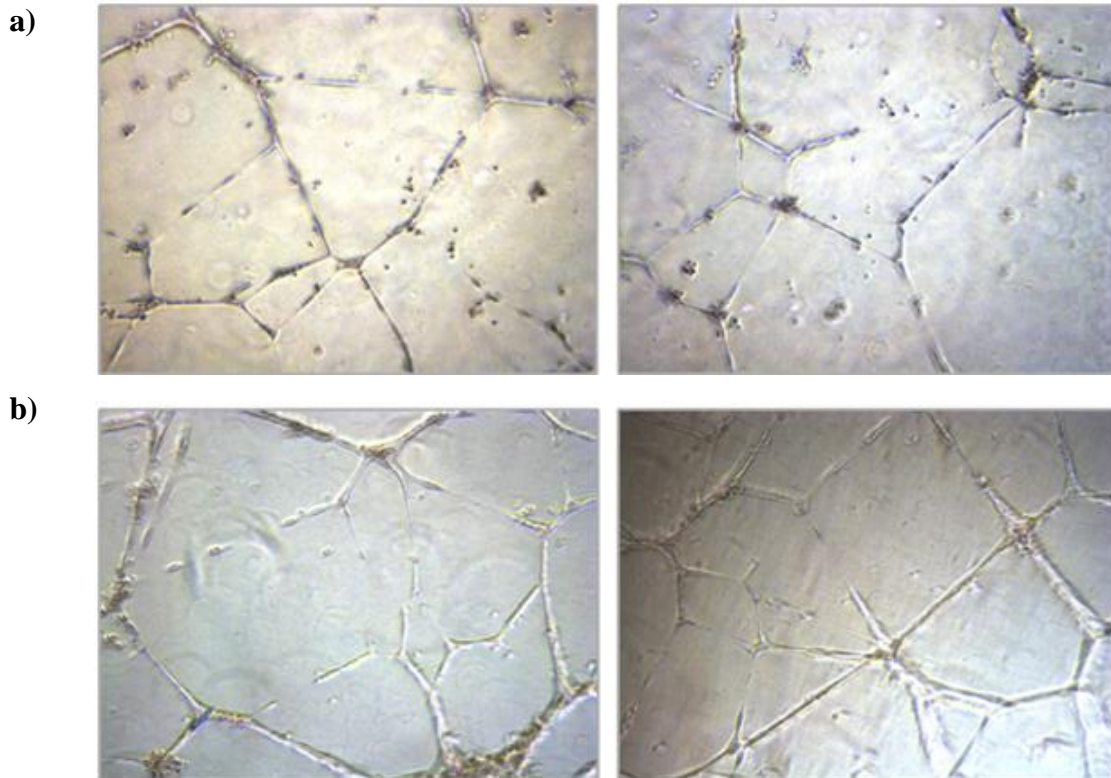


Abb. 4.28 HUVEC auf „BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix“ nach 48 Stunden: a) HUVEC in EBM-2* b) HUVEC in EGM-2 (2%FCS) 5x Vergrößerung

Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass sich die Wachstumsfaktoren hEGF, hFGF-b, VEGF und IGF-1 positiv auf eine stabile Netzwerkbildung auszubilden.

Im Anschluss an diese Experimente wurde untersucht, ob die Inkubation mit Leptin anstelle der beschriebenen Faktoren eine stabile Netzwerkbildung induziert. Hierzu wurde neben dem üblichen „Matrigel“ mit einem wachstumsfaktorreduzierten „Matrigel“ („BD Matrigel™ Matrix Growth Factor

Reduced (GFR)“ gearbeitet, um das Angebot an Wachstumsfaktoren stärker kontrollieren zu können.

Das „BD Matrigel™ Matrix Growth Factor Reduced (GFR)“ weist geringere Konzentrationen der Wachstumsfaktoren EGF, IGF-1, PDGF und TGF- β auf. Damit erlaubt es die Konstruktion von höher definierten Netzwerken, deren Aufbau stärker von stimulierenden Faktoren abhängt. Als Positivkontrolle wurden Zellen statt mit Leptin mit dem stark angiogen wirkenden Wachstumsfaktor VEGF behandelt.

Es konnten im Rahmen dieser Arbeit in diesen Versuchen jedoch keine signifikant verstärkte Netzwerkbildung durch Leptin oder VEGF festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Um einen Angiogenese-stimulierenden Effekt von Leptin und VEGF nachzuweisen, muss der Versuchsaufbau weiter bezüglich des Angebots an Wachstumsfaktoren im Medium und dem „Matrigel“ optimiert werden (s. 5.3 „*Das Angiogenese-Modell mit „BD Matrigel“*“ und 5.5 „*Ausblick*“).

5 Diskussion

5.1 Analyse der Zytokine im malignen Aszites

5.1.1 Quantifizierung der Zytokine im malignen Aszites

Die Quantifizierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren im malignen Aszites fiel für einige positive, für andere negativ aus. Von den untersuchten Zytokinen und Wachstumsfaktoren waren die Folgenden nicht oder nur in vereinzelten Proben detektierbar: IL-1 β , IL-4, IL-12, IL-13, GM-CSF, TNF- α , Epiregulin, Amphiregulin (s. 4.1.1). Die nachweisbaren Zytokine unterlagen einer relativ hohen Streuung und lagen im Vergleich untereinander auf verschiedenen Niveaus.

Die Quantifizierung von Zytokinen in Aszites mittels kommerzieller ELISA Kits weist Schwierigkeiten auf, da diese Kits für die Ermittlung von Zytokinen in Serum oder Plasma optimiert sind. Serum bzw. Plasma unterscheiden sich von Aszites durch die Konzentration von Protein. Der Referenzwert für das Gesamteiweiß im Serum liegt bei 60-84 mg/ml, die eigenen Messungen im Aszites ergaben eine mediane Konzentration von 44,6 mg/ml. Ob die niedrigere Konzentration von Protein die Messung negativ beeinflusst, kann nicht sicher ausgeschlossen werden und auch der Hersteller macht hierzu keine Angaben.

5.1.2 Statistische Auswertung der erhobenen Daten

Von den 31 Proben wurden aus organisatorischen Gründen nicht alle gleichermaßen auf alle Merkmale untersucht. Die Verteilung der Analyse unterliegt jedoch keiner systematischen Auswahl, sondern ist der zeitlichen

Staffelung der Probengewinnung und –analyse geschuldet. So kann ein willkürlich herbeigeführter Selektionsbias ausgeschlossen werden. Es wurden bei der Berechnung der Korrelationen ein deutlichen Ausreisser (IL6 >10000pg/ml) aus der Statistik ausgeschlossen. Für alle anderen Berechnungen wurden alle Daten verwendet. Dieses Vorgehen steigert die Validität.

Aufgrund der hohen Streuung der Werte wurde über die Ermittlung von arithmetischen Charakteristika wie Mittelwert oder Median hinaus eine Darstellung anhand von Streudiagrammen bevorzugt, da diese die tatsächlich gemessenen Werte deutlicher in Relation zueinander widerspiegeln.

Die Patientinnen, die in der Analyse berücksichtigt wurden, wurden zufällig ausgewählt. Die Tumore entsprachen bis auf dem einer Teilnehmerin einer histologischen Klassifikation und einem ähnlichen Grading (G2 und G3), sodass diesbezüglich von einem untereinander vergleichbaren Kollektiv ausgegangen werden kann. Das Alter der Patientinnen zeigt eine gewisse Streuung, jedoch ist eine differenzierte Betrachtung einzelner Altersgruppen bei der Gesamtzahl von 31 Teilnehmerinnen weder möglich noch sinnvoll.

Zur Analyse der gemessenen Werte wurden verschiedene Korrelationen errechnet. Dabei ist die Korrelation nach Pearson anhand des Korrelationskoeffizienten r eine gut etablierte Methode um Korrelationen von metrischen Variablen zuverlässig zu berechnen. Prinzipiell besteht bei der Ermittlung von Korrelationen jedoch immer die Gefahr, dass diese zu einem Teil auf einem Confounder beruhen, dass also eine störende Drittvariable existiert, die zusätzlich zur betrachteten Ursache die ermittelte Wirkung mit hervorruft. Um diesen Fehler zu vermeiden, wurde darauf verzichtet Risikofaktoren, die bekannterweise häufig gemeinsam mit anderen Risikofaktoren vergesellschaftet sind und ein bestimmtes Verhalten widerspiegeln, (beispielsweise BMI und Rauchen) zu analysieren. Stattdessen wurden die einzelnen Zytokine direkt bestimmt und mit dem Endpunkt, dem rezidivfreien Überleben, abgeglichen. Jedoch kann man die Verzerrung durch einen Confounder nie vollständig

ausschließen und solange keine kausalen Zusammenhänge bewiesen sind sollten Korrelationen immer unter diesem Aspekt betrachtet werden.

Die Nutzung des Kaplan-Meier-Schätzers zur graphischen Darstellung von Überlebensraten zweier Populationen ist ebenfalls ein weit genutztes Verfahren. Das Standardverfahren zum Vergleich der Überlebensraten von zwei Populationen ist der logrank-Test. Dieser nichtparametrische Test erlaubt Vergleiche zwischen zwei oder mehr unabhängigen Populationen, sofern nur eine Einflussvariable untersucht wird, und ist damit der hier geeignete Test. Die nachträgliche Zuordnung der Studienobjekte in zwei Populationen (Zytokin hoch bzw. niedrig) ist in ihrer Aussagekräftigkeit und Validität der zufälligen Randomisierung vor Studienbeginn unterlegen. Im Rahmen dieser Studie war eine zuvorige Randomisierung jedoch nicht möglich, da die entscheidende Einflussvariable erst im Verlauf erhoben wurde. Die Wahl des jeweiligen cutoff-Punktes, der zur Zuweisung der Studienobjekte in die beiden Gruppen führte, erfolgte mittels des web-basierten Programms „cutoff finder“ - außer bei der Berechnung des cutoff Punktes von VEGF-A und VEGF-C, da hier das Programm aufgrund der zu kleinen Stichprobe keinen Wert ermitteln kann. Stattdessen wurde hier der Median der Messreihe verwendet. Dieses Programm errechnet den cutoff-Punkt, an dem der maximal signifikante Unterschied zwischen den beiden Überlebensraten erreicht wird. Dies führt dazu, dass die Studienobjekte nicht automatisch gleichmäßig auf beide Gruppen verteilt sind, wie dies beispielsweise bei Nutzung des Medians der Messreihe der Fall wäre. Aufgrund der hohen Streuung der Messwerte macht die Nutzung des Medians allerdings nur eingeschränkt Sinn. Unter Beachtung der Summenangabe n der Studienobjekte in den beiden Gruppen ist das angewandte Verfahren aber zweckmäßig und ausreichend transparent.

Bei Berücksichtigung der dargelegten Überlegungen zur Qualität der einzelnen statistischen Mittel zur Analyse der erhobenen Zytokinspiegel im malignen Aszites, können die unter *4.1 Analyse der Zytokine im malignen Aszites bei Ovarialkarzinom* beschriebenen Ergebnisse genutzt werden um einen Anhalt für die Bedeutung der Zytokine für das rezidivfreie Überleben zu gewinnen.

Von den Zytokinen, die sich signifikant mit dem rezidivfreien Überleben assoziiert zeigten – IL-6, IL-10, LIF, S100A8, TGF- β – sowie der Tumormarker CA-125, konnte auch bei allen eine deutliche Korrelationen untereinander ermittelt werden.

Dies betrifft insbesondere IL-6 und LIF sowie in geringerem Ausmaß IL6 und IL10, wobei alle drei STAT3-aktivierende Zytokine sind. Dies verdeutlicht die Erkenntnis, dass der STAT3-Signalweg eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des Ovarialkarzinoms darstellt. Antagonisierung des STAT3-Signalweges könnte eine vielversprechende Therapieoption beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom sein. Wen et al. haben 2014 gezeigt, dass der Knockdown von STAT3 im Mausmodell zu einer verringerten Tumorprogression, einer verminderten Disseminierung und geringeren Aszitesproduktion führte und dass die STAT3 Aktivität mit dem IL6-Level korrelierte.

Die Korrelation des Wachstumsfaktors M-CSF und des Tumorfaktors CA-125 könnte ein Hinweis für das Ausmaß der Tumorlast sein, da beide von Tumorzellen sezerniert werden. Die Korrelationen von ANGPTL4 und TGF- β sowie von S100A8 und TGF- β werden von dem Umstand bestätigt, dass sowohl ANGPTL4, als eventuell auch S100A8 Zielgene von TGF- β sind (Ye et al., 2015; Padua et al., 2008)

Diese Zusammenhänge unterstützt die Aussagekraft der gewonnenen Daten und deutet darauf hin, dass die Höhe der genannten Zytokinwerte tatsächlich in einem Zusammenhang mit dem rezidivfreien Überleben steht. Dies führt zu dem Schluss, dass einige der Zytokine neben dem Tumormarker CA-125 als Biomarker zum Monitoring der Tumorlast und der Prognose dienen könnten.

Wie eingangs in der Einleitung beschrieben, ist Übergewicht als ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms bekannt und ein erhöhter BMI in der Literatur häufig mit einem erhöhten Serumspiegel von Leptin assoziiert. Eine Studie von Uddin et al. konnte darüber hinaus ein kürzeres progressionsfreies Überleben von Patientinnen mit hoher Expression des Leptin-Rezeptors (Ob-R) zeigen (Uddin et al., 2009).

Auch in dieser Studie zeigte sich eine deutliche positive Korrelation zwischen dem BMI und dem Leptinspiegel im malignen Aszites. Die Betrachtung des Einflusses auf das rezidivfreie Überleben der Patientinnen erbrachte hingegen keine signifikanten Ergebnisse. Das mediane rezidivfreie Überleben ist in der Gruppe mit niedrigen Messwerten zwar um sechs Monate länger (19 vs. 13 Monate), allerdings liegt der p-Wert bei 0,1638, sodass nicht von einer ausreichenden Signifikanz ausgegangen werden kann. Da jedoch nur 20 Proben auf die Konzentration von Leptin im malignen Aszites untersucht wurden, ist anzunehmen, dass bei größerer Stichprobe und längerem Beobachtungszeitraum signifikantere Ergebnisse erzielt werden könnten.

5.2 Der pro-proliferative Effekt von Leptin auf Ovarialkarzinomzellen

In der Literatur ist bereits ein proliferationsstimulierender Effekt von Leptin auf Ovarialkarzinomzellen beschrieben (Chen et al., 2013; Ptak et al., 2013). Für diese Analysen wurden meist photometrische Messungen zur Analyse der metabolischen Aktivität oder einfache Zellzahlbestimmungen genutzt, welche nur eine Endpunktbestimmung erlauben. Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit hingegen wurde eine neue Technologie herangezogen, die eine Echtzeitanalyse der Zellen ermöglicht. Die Beurteilung der Proliferation der Zellen wird dadurch ungleich informationsreicher und damit valider.

Das „xCELLigence RTCA DP“ System (Acea Biosciences, Bremen) ermittelt auf der Basis von Impedanzmessungen durch Goldelektroden am Boden der Zellkulturplatte einen dimensionslosen Wert, Zellindex genannt (vgl. 3.2.2.6). Dieser Wert ist ein Maß für die von Zellen bedeckte Fläche sowie die Zelladhärenzstärke. Mit steigender Flächenbedeckung und Zelladhärenz steigt

die gemessene Impedanz (der Wechselstromwiderstand) durch die isolierende Eigenschaft der Zellen an.

In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten mit SKOV3-Zellen zeigte sich eine dosisabhängige Erhöhung des Zellindex unter Leptinbehandlung (vgl. 4.2.1.1).

Die Werte wurden zunächst um Artefakte durch die Zelladhärenz zu vermeiden auf einen Zeitpunkt 1,5 Stunden nach Start des Experimentes (also zwei Stunden nach Aussaat der Zellen) normalisiert. Der etwaige Einfluss von Leptin auf die Kinetik der Zelladhärenz sollte nicht in die Betrachtung mit einfließen. Die hierdurch entstehende Beeinflussung der Werte sollte bei deren Beurteilung stets berücksichtigt werden. Die Relation der Zellindexwerte unter den jeweiligen Bedingungen bleibt dabei jedoch unverändert. Die Erhöhung des Zellindex um durchschnittlich 12 % (Behandlung mit 10 ng/ml Leptin) bzw. 52 % (Behandlung mit 100 und 200 ng/ml Leptin) kann angesichts der jeweiligen Standardabweichungen und dem dosisabhängigen Effekt als signifikant und nicht rein zufällig angesehen werden. Darüber hinaus spricht die Ähnlichkeit des Verlaufs insgesamt, der sich nur in der Höhe des maximal erreichten Zellindex unterscheidet, für valide Daten. Auf Grundlage dieser Werte kann auf eine mäßig erhöhte (um 12% höherer Zellindex) bis bedeutend erhöhte (um 52 % erhöhter Zellindex) Proliferation unter Behandlung mit Leptin geschlossen werden.

Der Zellindex gibt jedoch nicht differenziert Aufschluss über die einzelnen Zelleigenschaften Proliferation, Morphologie und Adhärenzstärke, sondern kann nur aus der errechneten Impedanz Rückschlüsse auf diese Parameter zulassen. Dadurch kann es zwar potentiell zu Fehlschlüssen kommen, jedoch gehen die Eigenschaften Proliferation und Adhärenzstärke insbesondere in der Tumorbilogie erwartungsgemäß miteinander einher bzw. widersprechen sich nicht.

Unter allen Bedingungen ist nach ca. 42 Stunden ein Maximalwert erreicht. In technischer Hinsicht erwartet man einen maximalen Zellindex, wenn die komplette Elektrodenfläche von Zellen bedeckt ist. Das Zeitfenster, in dem man

die Zellen ohne erneutes Teilen der Kultur beobachten kann ist damit insbesondere bei schnell proliferierenden Zellen begrenzt und wurde durch geeignete Zellzahl bei Aussaat optimiert. Die Tatsache, dass der Maximalwert unter allen Bedingungen zur etwa gleichen Zeit erreicht wird, jedoch auf unterschiedlicher Höhe liegt, ist mit einer unterschiedlichen Proliferationsgeschwindigkeit nicht vollständig erklärbar. Möglicherweise ist zu diesem Zeitpunkt der Gehalt an Nährstoffen im Medium stark abgesunken, sodass die Zellen sich nicht weiter teilen, obwohl unter Umständen noch Raum zur Verfügung stünde. Es wäre aber auch denkbar, dass der Amplitudenunterschied zwischen den Maximalindexwerten von behandelten und unbehandelten Zellen das Ausmaß einer stärkeren Adhärenz bei gleicher Zellzahl anzeigt. Aus diesem Grund wurde zur Beurteilung der Proliferation die Verdopplungszeit vom System auf Basis des Zellindex errechnet. Dies macht entsprechend voriger Überlegung nur im Zeitfenster bis 42 Stunden Sinn, wenn die Werte noch eine Steigung aufweisen.

Die Analyse der Verdopplungszeiten erfolgt anhand definierter Zeitintervalle. Dabei wurde die Aufteilung in vier Intervalle von jeweils 6 Stunden als sinnvoll erachtet. Die Daten zu den Zeitpunkten bis 18 Stunden nach Start des Experiments zeigen keine bedeutenden Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen und sind daher nicht gezeigt. Bei Betrachtung der Verdopplungszeiten der Zellen fällt im Intervall 18 bis 24 Stunden nach Start des Experiments kein wesentlicher Unterschied zwischen den mit Leptin behandelten und unbehandelten Zellen auf. Da die Zellen sich nach Aussaat erst neu adhären und Zellkontakte aufbauen müssen, ist in dieser Phase auch mit keiner durch Leptin verstärkten Proliferation zu rechnen. Die Daten zur Verdopplungszeit im Zeitintervall 24 bis 30 Stunden nach Aussaat (um 35 % bzw. 11 % verlängerte Verdopplungszeit unter 100 ng/ml bzw. 200 ng/ml Leptin) fallen insgesamt aus der Reihe und weichen von der Tendenz einer Verkürzung der Verdopplungszeit unter Leptineinfluss zu den späteren Zeitpunkten ab. Es ist daher anzunehmen, dass diese Schwankungen zufällig sind. In den Zeitintervallen nach 30 Stunden zeigt sich eine verkürzte

Verdopplungszeit bei allen mit Leptin behandelten Zellen. Aufgrund der Dosisabhängigkeit der Proliferationssteigerung, der Verstärkung im Laufe der Zeit und der geringen Standardabweichung kann von validen Daten ausgegangen werden. Die Auswertung der Versuche mit dem „xCELLigence RTCA DP“ System weist einige, oben beschriebene, Schwächen auf, jedoch kann abschließend der in der Literatur beschriebene proliferationsstimulierende Effekt von Leptin bestätigt werden.

5.3 Das Angiogenesemodell mit „BD Matrigel“

Wie unter 3.2.2.5 eingangs beschrieben, kann das „BD Matrigel“ für Angiogenesemodelle genutzt werden. In den Versuchen dieser Arbeit sollte das Modell in seinen ersten Schritten etabliert werden um im Anschluss den Effekt von den Stimulantien Leptin und VEGF auf die Angiogenese zu untersuchen.

Versuche mit dem „BD Matrigel“ bergen viele Problematiken. Die optimale Zellzahl muss in Voruntersuchungen ermittelt werden, da die Endothelzellen bei zu niedriger Zellzahl keine Kontakte ausbilden und bei zu hoher Zellzahl ihr normales, adhärentes Wachstumsmuster beibehalten. Bei HUVEC sollten darüber hinaus nur wenige Passagierungen erfolgt sein, da diese die Fähigkeit zur Netzbildung mit steigender Passagezahl ($p > 5$) einstellen. Die Konzentration und Dicke des ausplattierten „Matrigels“ hat zusätzlich wesentlichen Einfluss auf die Struktur der Netzbildung. Trotz sorgfältigem Befolgen der Arbeitshinweise des Herstellers „BD Biosciences“ mussten die optimalen Bedingungen in vielen Experimenten ermittelt werden. Die Auswertung der Ergebnisse erlaubt einen gewissen Spielraum und hängt somit zu einem Teil von der auswertenden Person ab. Es muss korrekterweise damit gerechnet werden, dass die Auswertung somit einem „detection bias“ unterliegt, also dem unterbewussten unterschiedlichen Beurteilen abhängig von der Zugehörigkeit zu einer Testgruppe.

Die Stimulation mit Leptin und VEGF zeigte nicht den erwarteten Effekt. Insbesondere VEGF gilt als der am stärksten angiogenetisch wirkende Faktor, aber auch vom Leptin ist in der Literatur ein pro-angiogenetischer Effekt beschrieben.

Dass die Ergebnisse nicht mit denen der Literatur übereinstimmen, könnte an einem nicht ausreichend optimierten Nährstoffangebot liegen. Sind zu viele proliferativ wirkende Faktoren im Angebot, könnte dieser Stimulus zu Lasten der Stimulation der Angiogenese überwiegen. Ist hingegen das Angebot an Wachstumsfaktoren zu niedrig, regulieren die Zellen den Stoffwechsel herunter und werden nicht adäquat zur Angiogenese gereizt.

Insgesamt entsteht der Eindruck, dass die Ergebnisse des Angiogenesemodells mittels „BD Matrigel“ einer hohen Variabilität unterliegen und die Art der Netzbildung neben der Stimulierung stark von dem Angebot an Wachstumsfaktoren im Umfeld – Kulturmedium und „Matrigel“ - abhängen. Eine gute Alternative sind möglicherweise vorgefertigte Kits, wo Endothelzellsphäroide direkt in eine Kollagenmatrix eingebettet sind und nur noch die Testsubstanz zugegeben werden muss. Dies ermöglicht eventuell vergleichbarere Ergebnisse. Jedoch besteht auch bei Schaffung von gleichen Kulturbedingungen für alle betrachteten Zellen immer noch die Schwierigkeit der validen Auswertung der Güte der Netzbildung. Auerbach et al. haben 2003 eine Übersichtsarbeit publiziert, in der sie die gängigen Angiogeneseassays verglichen haben. Sie kamen ebenfalls zu dem Fazit, dass das Angiogenesemodell mittels „Matrigel“ ein praktisches Verfahren ist um erste Hinweise auf das Verhalten von Endothelzellen wie HUVEC unter Stimulation mit diversen Substanzen zu erhalten, dass für die weitere Verifizierung der Daten aber andere Verfahren notwendig sind. Insbesondere sollten immer in-vivo Experimente folgen, da nur hier die komplexe Biologie der Angiogenese verlässlich beurteilt werden kann (Auerbach et al., 2003).

5.4 Die Signaltransduktion in Ovarialkarzinomzellen unter Leptinstimulation

Die Untersuchungen zur Signaltransduktion in Ovarialkarzinomzellen unter Leptinstimulation erfolgten mittels Western Blot und PCR, zwei sehr gut etablierten Verfahren mit insgesamt hoher Sensitivität und Spezifität.

5.4.1 Aktivierung des MAPK/ERK-Signalweges unter Leptin

Der Nachweis einer verstärkten Aktivität von ERK bei einer Stimulation mit bis zu 100 ng/ml Leptin auf Proteinebene unterstützt die These, dass Ovarialkarzinomzellen auf Leptin reagieren.

Wie eingangs beschrieben, vermitteln die Kinasen ERK 1 und 2 insbesondere Signale durch Mitogene. Weiterhin ist bekannt, dass dieser Signalweg in etwa 30% der Tumore konstitutiv aktiv ist. Möglicherweise ist mit Leptin somit ein Zytokin gefunden, das als Mitogen zur verstärkten Proliferation der Ovarialkarzinomzellen führt (siehe Abschnitt 4.2). Darüber hinaus ist bekannt, dass der MAPK-Signalweg bei konstitutiver Aktivierung in Assoziation zur Chemoresistenz der Tumorzellen steht. Dies würde in Verbindung zu einem kürzeren rezidivfreien Überleben stehen. Auch wenn diesbezüglich kein signifikantes Ergebnis ermittelt werden konnte (siehe 4.1.4), scheint es wahrscheinlich, dass sich bei höherer Stichprobe dieser Effekt zeigt.

5.4.2 Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges durch Leptin

Wie schon unter 4.3.2 beschrieben, vermittelt der PI3K/AKT-Signalweg insbesondere Signale, die eine verstärkte Zellproliferation und Inhibition der Apoptose bewirken. Eine Mutation und damit einhergehende konstitutive

Aktivität von AKT ist bereits für das Ovarialkarzinom beschrieben (Hanrahan et al., 2012).

Im Gegensatz zu dem Verlauf der Signaltransduktion des Leptinsignals über den MAPK/ERK-Signalweg führten hier bereits kleinere Dosen (50 ng/ml Leptin) schon früh (nach 10 Minuten) zu einer maximalen Phosphorylierung von AKT. Es wäre denkbar, dass in diesen Tumorzellen bereits eine Hochregulierung von Rezeptoren, die mit der PI3-Kinase interagieren, stattgefunden hat und es so schneller und bei geringeren Dosen zu einer maximalen Phosphorylierung von AKT kommt. Eine Arbeit des Cancer Genome Atlas Research Network zeigten, dass von 316 untersuchten Fällen von hochgradigem serösem OC in 45% der Fälle eine Mutation des PI3K/Ras Signalweges vorlag. In 7% der Fälle fand sich eine Deletion des Tumorsuppressors PTEN, in 18% der Fälle lag eine Amplifikation von PI3K vor, in 3% eine Amplifikation von Akt1 und in 6% eine Amplifikation von Akt2 (Cancer Genome Atlas Research Network, 2011). Die weitere Forschung an inhibitorischen Antikörpern, die amplifizierte Mediatoren in essentiellen Signalwegen inhibieren können, ist daher grundlegend. Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen es ebenso sinnvoll erscheinen, weiter zu erforschen, ob die Inhibierung von Zytokinen wie Leptin zusätzlich hilft die Überaktivität des PI3K/Ras-Signalweges zu reduzieren.

5.4.3 Die Rolle des STAT3-Signalweges

Keine der untersuchten Zelllinien, darunter zwei Ovarialkarzinomzelllinien, zeigte eine verstärkte Aktivität von STAT3 unter Leptinstimulation. Sowohl BG1 als auch SKOV3 Zellen reagierten erwartungsgemäß auf IL-6 mit einer verstärkten Aktivierung von STAT3, die sowohl im Western Blot als auch in der qPCR anhand von Zielgenen nachweisbar war. Daher kann von einer ausreichenden Sensitivität des anti-pSTAT3-Antikörpers und der STAT3-Primer ausgegangen werden. Die Spezifität des Antikörpers wurde in Untersuchungen mit HUVEC anhand der Supprimierbarkeit des basalen pSTAT3-Levels durch

einen JAK2-Inhibitor ebenfalls getestet. Versuche mit einer Behandlung mit IL-6 und einem anti-IL-6-Antikörper in Makrophagen ergaben, dass die durch IL-6 induzierte STAT3-Aktivierung sich sicher auf IL-6 zurückführen lässt. Da insbesondere in SKOV3-Zellen und HUVEC zum Teil eine hohe basale STAT3-Aktivität zu beobachten war, wurde in HUVEC untersucht, ob eine Supprimierung von basalem pSTAT3 durch einen anti-IL-6-Antikörper zu einer durch Leptin induzierbaren STAT3-Phosphorylierung führt, was aber nicht zu beobachten war.

Die Stimulation mit Leptin erfolgte mit einem breiten Konzentrationsspektrum, um Fehler bei der Dosisfindung auszuschließen. Um zu vermeiden, dass eine frühe Dephosphorylierung den Nachweis von pSTAT3 nach 30 Minuten verhindert, wurde auch eine Kinetik der STAT3-Aktivität in SKOV3-Zellen mitgeführt, die aber auch keine Aktivierung von STAT3 in frühen Phasen nachweisen konnte.

5.5 Ausblick

Die Aussagekraft und insbesondere die externe Validität von Analysen anhand von Stichproben hängen immer auch von der Größe der Stichprobe ab. In dieser Arbeit wurde die Auswertung mit 31 Patientinnen begonnen, das Projekt läuft jedoch weiter. In wenigen Jahren werden die Daten die Möglichkeit zu einer noch valideren Auswertung vorhalten, zum einen durch eine Vergrößerung der Stichprobe und zum anderen durch eine längere Beobachtungszeit.

Mit Erweiterung der Daten könnte auch nachvollzogen werden, ob sich der proliferative Effekt von Leptin auf Ovarialkarzinomzellen, der in dieser Arbeit beobachtet wurde, in einer verkürzten rezidivfreien Zeit bestätigt. In diesem Fall würden weitere Experimente zur Inhibierung der vermittelnden Signalwege (MAPK/ERK und PI3K/AKT) Aufschluss über einen möglichen Angriffspunkt

gezielter Therapie mittels spezifischer Antikörper geben. Es wäre sinnvoll in weiteren Arbeiten zu untersuchen, ob eine Inhibierung der Zytokine bzw. Tumormarker, die sich hier als signifikant prognosebestimmend erwiesen haben (CA-125, IL-6, IL-10, LIF, S100 A8, TGF- β), in in-vitro Experimenten auch einen anti-proliferativen Effekt auf Ovarialkarzinomzellen aufweist.

Nach Ermittlung der zum Teil sehr starken Korrelationen der Zytokine untereinander (insbesondere LIF und IL-6) wäre es darüber hinaus sinnvoll, zu überprüfen, ob die Effekte der Zytokine sich gegenseitig potenzieren und welche molekularen Mechanismen dafür verantwortlich sein könnten.

Abschließend bleibt das Ergebnis der STAT3-Induktion unter Leptineinfluss zu diskutieren. Die fehlende STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation mit Leptin steht in Diskrepanz zur Literatur. Auch nach Kontrolle aller relevanten Variablen konnte dieser Widerspruch im Rahmen der Arbeit nicht aufgeklärt werden. Es wurden die gleichen Zelllinien verwendet, von denen in Publikationen die Existenz des Rezeptors für Leptin mehrfach nachgewiesen wurde (BG-1, SKOV-3, HUVEC). Des Weiteren wurde Leptin in einem Konzentrationsspektrum eingesetzt, wie es auch in anderen Publikationen genutzt wird. Darüber hinaus wurden stets Kontrollen mit IL-6 als starker Induktor des STAT3-Signalwegs mitgeführt. Auch andere Regulatoren des STAT3-Signalwegs (Tocilizumab, IL-6-Antikörper, AG-490) wurden zur Sicherstellung der Spezifität des anti-STAT3-Antikörpers genutzt. Die Funktionalität des Leptins zeigte sich sowohl im Proliferationsassay als auch in der Aktivierung des MAPK- und AKT-Signalweges. Außerdem wurden im Rahmen der Arbeit zwei verschiedene Chargen Leptin von verschiedenen Herstellern genutzt, die gleiche Ergebnisse lieferten.

6 Literaturverzeichnis

1. C. Aghajanian *et al.*, OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol* **30**, 2039-2045 (2012)
2. T. Al Rawahi *et al.*, Surgical cytoreduction for recurrent epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* **2**, Cd008765 (2013)
3. A. C. Antoniou *et al.*, Reproductive and hormonal factors, and ovarian cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**, 601-610 (2009)
4. R. Auerbach *et al.*, Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem* **49**, 32-40 (2003)
5. V. Beral *et al.*, Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* **369**, 1703-1710 (2007)
6. A. Burges *et al.*, Ovarian cancer: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.*, **108(38)**: 635–41 (2011)
7. S.S. Buys, *et al.*, Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*, **305(22)**, 2295-303 (2011)
8. C. Chen *et al.*, Leptin stimulates ovarian cancer cell growth and inhibits apoptosis by increasing cyclin D1 and Mcl-1 expression via the activation of the MEK/ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Oncol* **42**, 1113-1119 (2013)

9. BP Cheppudira *et al.*, Anti-hyperalgesic effects of AG490, a Janus kinase inhibitor, in a rat model of inflammatory pain. *Biomedical Reports*. **3(5)**:703-706 (2015)
10. F. Chiaffarino *et al.*, Risk factors for ovarian cancer histotypes. *Eur J Cancer* **43**, 1208-1213 (2007)
11. J. H. Choi *et al.*, Expression of leptin receptors and potential effects of leptin on the cell growth and activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 207-210 (2005)
12. J.-H. Choi *et al.*, Estrogen receptor alpha pathway is involved in leptin-induced ovarian cancer cell growth. *Carcinogenesis* **32**, 589-596 (2011)
13. M. Christie *et al.*, Molecular pathology of epithelial ovarian cancer. *J Br Menopause Soc* **12**, 57-63 (2006)
14. D. Cibula *et al.*, Tubal ligation and the risk of ovarian cancer: review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*, **17(1)**, 55-67 (2011)
15. N. Colombo *et al.*, A phase II study of aflibercept in patients with advanced epithelial ovarian cancer and symptomatic malignant ascites. *Gynecologic Oncology*, **125(1)**, 42–47 (2012)
16. J. Diebold, Molecular carcinogenesis of ovarian carcinoma: *Verh Dtsch Ges Pathol.*, **89**, 77-83 (2005)
17. A. du Bois *et al.*, A Randomized Clinical Trial of Cisplatin/Paclitaxel Versus Carboplatin/Paclitaxel as First-Line Treatment of Ovarian Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **95**, 1320-1329 (2003)
18. A. du Bois *et al.*, Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe

- Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* **115**, 1234-1244 (2009)
19. D. A. Dumesic *et al.*, Cancer risk and PCOS. *Steroids* **78**, 782-785 (2013)
20. R. Ferla *et al.*, Glioblastoma-Derived Leptin Induces Tube Formation and Growth of Endothelial Cells: Comparison with VEGF Effects. *BMC Cancer* **11**;303 (2011)
21. R. Forstner *et al.*, ESUR guidelines: ovarian cancer staging and follow-up. *Eur Radiol*, **20(12)**, 2773-80 (2010)
22. Goff BA *et al.*, Development of an ovarian cancer symptom index: possibilities for earlier detection. *Cancer* **109(2)**, 221-7 (2007)
23. Z. Han *et al.*, Silencing of the STAT3 signaling pathway reverses the inherent and induced chemoresistance of human ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **435**, 188-194 (2013)
24. A.J. Hanrahan *et al.*, Genomic complexity and AKT dependence in serous ovarian cancer. *Cancer Discov*, **2(4)**, 376 (2012)
25. E. Jequier, Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* **967**, 379-388 (2002)
26. L. Klampfer, Signal transducers and activators of transcription (STATs): Novel targets of chemopreventive and chemotherapeutic drugs. *Curr Cancer Drug Targets* **6**, 107-121 (2006)
27. M. Kleppe *et al.*, Lymph node metastasis in stages I and II ovarian cancer: A review, *Gynecologic Oncology*, **123(3)**, 610-614, (2011)
28. I. Kryczek *et al.*, B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* **203**, 871-881 (2006)

29. J. Kumar *et al.*, Role of the interleukin 6 receptor family in epithelial ovarian cancer and its clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta* (2013)
30. M. L. Kurta *et al.*, Use of fertility drugs and risk of ovarian cancer: results from a U.S.-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **21**, 1282-1292 (2012)
31. D. Lane *et al.*, Ovarian cancer ascites protects from TRAIL-induced cell death through $\alpha\beta 5$ integrin-mediated focal adhesion kinase and Akt activation. *Oncogene*. **107** (2010)
32. E. Lanitis *et al.*, Chimeric antigen receptor T cells with dissociated signaling domains exhibit focused anti-tumor activity with reduced potential for toxicity in vivo. *Cancer Immunol Res* **1**, (2013)
33. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 1.1, 2013, AWMF-Registernummer: 032/035OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>, [Stand: 10.03.2014]
34. M. F. Leitzmann *et al.*, Body mass index and risk of ovarian cancer. *Cancer* **115**, 812-822 (2009)
35. M. Liu *et al.*, Blockage of STAT3 signaling pathway with a decoy oligodeoxynucleotide inhibits growth of human ovarian cancer cells. *Cancer Invest* **32**, 8-12 (2014)
36. X. G. Ma *et al.*, Clinicalpathological characteristics of Lynch syndrome related epithelial ovarian cancer. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **47**, 201-204 (2012)
37. I. Matte *et al.*, Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *Am J Cancer Res* **2**, 566-580 (2012)

38. L. Mørch *et al.*, Hormone therapy and ovarian cancer. *JAMA* **302**, 298-305 (2009)
39. G. G. Muralidhar *et al.*, Chemokine Receptors in Epithelial Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 361-376 (2014)
40. D. Padua *et al.*, TGF β primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*, **133**(1), 66–77. (2008)
41. A. Papadia *et al.*, Growth hormone-releasing hormone antagonists inhibit growth of human ovarian cancer. *Horm Metab Res* **43**, 816-820 (2011)
42. G. Pearson *et al.*, Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**, 153-183 (2001)
43. T. J. Perren *et al.*, A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med* **365**, 2484-2496 (2011)
44. A. Ptak *et al.*, Cooperation of bisphenol A and leptin in inhibition of caspase-3 expression and activity in OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Toxicology in Vitro* **27**, 1937-1943 (2013)
45. A. Ptak *et al.*, Leptin stimulation of cell cycle and inhibition of apoptosis gene and protein expression in OVCAR-3. *Endocrine* **43** (2) S. 394-403 (2013)
46. T. R. Rebbeck *et al.*, Meta-analysis of Risk Reduction Estimates Associated With Risk-Reducing Salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 Mutation Carriers. *Journal of the National Cancer Institute* **101**, 80-87 (2009)
47. S. Reinartz *et al.*, Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse. *Int J Cancer* **134**, 32-42 (2014)

48. T. Riman *et al.*, Hormonal aspects of epithelial ovarian cancer: review of epidemiological evidence. *Clin Endocrinol (Oxf)* **49**, 695-707 (1998)
49. C. Rodriguez *et al.*, Body mass index, height, and the risk of ovarian cancer mortality in a prospective cohort of postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 822-828 (2002)
50. G. J. Rustin, *et al.*, Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer (MRC OV05/EORTC 55955): a randomised trial. *Lancet*, **376** (9747), 1155-63 (2010)
51. K. E. Sheppard *et al.*, Synergistic inhibition of ovarian cancer cell growth by combining selective PI3K/mTOR and RAS/ERK pathway inhibitors. *Eur J Cancer* **49**, 3936-3944 (2013)
52. E. Smolle *et al.*, Malignant Ascites in Ovarian Cancer and the Role of Targeted Therapeutics. *Anticancer Research* **34**, 1553-1561 (2014)
53. K. L. Terry *et al.*, Incessant ovulation, mucin 1 immunity, and risk for ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**, 30-35 (2007)
54. The Cancer Genome Atlas Research Network, Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609–615 (2011)
55. J. B. Trimbos *et al.*, Impact of Adjuvant Chemotherapy and Surgical Staging in Early-Stage Ovarian Carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer–Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm Trial. *Journal of the National Cancer Institute* **95**, 113-125 (2003)
56. S. S. Tworoger *et al.*, Association of oral contraceptive use, other contraceptive methods, and infertility with ovarian cancer risk. *Am J Epidemiol* **166**, 894-901 (2007)

57. S. Uddin *et al.*, Overexpression of leptin receptor predicts an unfavorable outcome in Middle Eastern ovarian cancer. *Molecular Cancer* **8**, 74 (2009.)
58. M. N. Vansaun, Molecular pathways: adiponectin and leptin signaling in cancer. *Clin Cancer Res* **19**, 1926-1932 (2013)
59. M. Vessey *et al.*, Oral contraceptive use and cancer: final report from the Oxford–Family Planning Association contraceptive study. *Contraception* **88**, 678-683 (2013)
60. W. H. Gotlieb *et al.*, Intravenous aflibercept for treatment of recurrent symptomatic malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *The Lancet Oncology*, **13**(2), 154–162, (2011)
61. W. Wen *et al.*, Targeting JAK1/STAT3 signaling suppresses tumor progression and metastasis in a peritoneal model of human ovarian cancer. *Molecular cancer therapeutics* **13** (12), 3037–3048 (2014)
62. W. E. Winter, 3rd *et al.*, Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* **25**, 3621-3627 (2007)
63. Y. Xu *et al.*, Inhibition of JAK2 Reverses Paclitaxel Resistance in Human Ovarian Cancer Cells. *Int J Gynecol Cancer* [Epub ahead of print] (2015).
64. Y. Ye *et al.*, TGF β modulates inflammatory cytokines and growth factors to create premetastatic microenvironment and stimulate lung metastasis. *Journal of Molecular Histology* **46** (4), S. 365–375, (2015)

7 Anhang

7.1 Datentabelle

Patient #	Protein (mg/ml)	CA-125 (U/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	Leptin (pg/ml)	CCL-2 (pg/ml)	LIF (pg/ml)	M-CSF (pg/ml)	VEGFA (pg/ml)	VEGF-C (pg/ml)
ASZ_15	45,26	21534	1398	143	1455	965	674	7191		320
ASZ_17	58,02	21625	1734	416	8150	105	150	1461	8025	370
ASZ_18	43,22	3035	561	161	1082	166	174	1078	1693	420
ASZ_20	24,57	4177	5075	212	826	231	1629	2417	8506	0
ASZ_21	37,74	16856	2488	225	1454	386	1017	960	4964	370
ASZ_22	43,53	21504	5932	365	2578	129	1612	411	4603	420
ASZ_23	56,52	16312	1360	171	2199	274	234	1804		2920
ASZ_25	48,17	8679	2266	362	1895	102	195	1447	3127	700
ASZ_26	47,27	16170	548	93	3361	125	124	1878	3127	230
ASZ_27	50,8	44220	1343	77	703	110	81	7253		750
ASZ_28	35,87	1194	533	59	8326	204	39	3735	4739	700
ASZ_29	57,05	23577	4895	335	389	341	1644	931		740
ASZ_30	37,48	8600	1083	65	2743	92	172	1152	2666	350
ASZ_31	55,07	6061	1309	86	989	165	263	1070	4590	450
ASZ_36	14,78	1142	38	0	953	141	14	948	510	0
ASZ_37	138,81	2321	678	112	1385	131	843	1793	1796	340
ASZ_38	43,78	141190	5919	201	775	38,3	1518	9914		390
ASZ_41	40,3	13418	4592	519	1766	61,4	1202	888		
ASZ_42	31,73	1445	2079	210	214	230	192	414	8736	720
ASZ_43	59,84	0	1647	291	1603	199	555	0	701	
ASZ_46	36,06	0	3932	104		107	152	0		
ASZ_50	50,61	880	3577	188		268	706	785		
ASZ_51	43,7	1920	>10000	117		205	2232	870		
ASZ_54	44,58		4507	294		292	360	423		
ASZ_58	43,55		1164	128		331	186	3252		
ASZ_65	56,7		2207	366		175	634	419		
ASZ_66	59,5		795	208		223	235	780		
ASZ_67	36,8		302	137		136	160	555		
ASZ_68	42,4		1573	106		136	224	887		
ASZ_69	66,9		945	209		187	116	425		
ASZ_72	64,2		1486	728		425	141	0		

Patient #	TGF- β (pg/ml)	TGF- β (pg/mg protein)	ANGPTL4 (pg/ml)	ANGPTL4 (pg/mg Protein)	S100 A8 (pg/ml) R&D Kit	time-to-relapse	censored (Yes/No)	Patient age (y)
ASZ_15	1268	28	3154	70	476	13	no	69
ASZ_17	721	12	11400	196	294	14	no	66
ASZ_18	1938	45	2700	62	0	16	no	65
ASZ_20	765	31	5012	204	0	8	no	74
ASZ_21	1096	29	4180	111	0	12	no	48
ASZ_22	1111	26	2460	57	305	10	no	71
ASZ_23	1355	24	6990	124	0	26	no	72
ASZ_25	1158	24	3050	63	471	7	no	76
ASZ_26	978	21	961,6	20	239	13	no	74
ASZ_27	424	8	1220	24	378	16	no	72
ASZ_28	445	12	5030	140	0	36	yes	71
ASZ_29	2345	41	2450	43	0	19	no	46
ASZ_30	715	19	1010	27	334	27	no	54
ASZ_31	493	9	1030	19	0	34	yes	60
ASZ_36	128	9	908,8	61	142	31	yes	56
ASZ_37	426	3	2910	21	0	23	no	61
ASZ_38	1160	26	3300	75	1978	10	no	53
ASZ_41	4192	104	3591	89	9760	9	no	39
ASZ_42	1932	61	3030	95	0	27	yes	44
ASZ_43	2884	48	2611	44	0	15	no	55
ASZ_46	1167	32	3776	105	362	25	yes	61
ASZ_50	908	18	3487	69	0	24	yes	66
ASZ_51	3069	70	6781	155	0	21	no	49
ASZ_54	1078	24	3597	81	282	12	no	75
ASZ_58	2012	46	5403	124	0	18	yes	81
ASZ_65	2353	41	3970	70	0	14	yes	44
ASZ_66	1792	30	1682	28	273	14	yes	71
ASZ_67	628	17	1235	34	586	14	yes	87
ASZ_68	2063	49	3060	72	1813	12	no	62
ASZ_69	2508	37	2549	38	0	13	yes	62
ASZ_72	1701	26	1664	26	0	10	no	78

Patient #	surgery date	serous Adenokarzinom?	Grading	Histology	BMI
ASZ_15	18.04.2011	yes	G3	pT3c	27,5
ASZ_17	04.05.2011	yes	G2	pT3c	32,4
ASZ_18	17.05.2011	yes	G2	pT3c	
ASZ_20	21.06.2011	yes	G2-3	pT3c	18,6
ASZ_21	29.07.2011	yes	G2	pT3c	28,3
ASZ_22	17.10.2011	yes	G2	pT3c	30,5
ASZ_23	05.01.2012	yes	G2	pT3c	20,7
ASZ_25	30.01.2012	yes	G2	pT3c	27,7
ASZ_26	14.02.2012	yes	G2	pT3b	22,6
ASZ_27	05.03.2012	yes	G3	pT3c	20
ASZ_28	08.03.2012	yes	G3	pT3c	35,3
ASZ_29	13.03.2012	yes	G3	pT3c	24,4
ASZ_30	23.04.2012	yes	G3	pT3c	28,9
ASZ_31	22.05.2012	yes	G3	pT3c	21,1
ASZ_36	15.08.2012	yes	G2-3	pT3c	
ASZ_37	06.09.2012	yes	G2	pT3c	22,5
ASZ_38	08.10.2012	yes	G2	pT3c	24,8
ASZ_41	13.11.2012	yes	G3	pT3c	28,7
ASZ_42	05.12.2012	yes	G3	pT3c	22,1
ASZ_43	24.01.2013	gemischt muzinös / serös	G3	pT3c	32,6
ASZ_46	04.02.2013	yes	G3	pT3c	
ASZ_50	19.03.2013	yes	G3	pT3c	24,3
ASZ_51	25.03.2013	yes	G3	pT3c	23,1
ASZ_54	25.06.2013		G3	pT3c	30,5
ASZ_58	18.09.2013		G3	pT3b	
ASZ_65	06.01.2014		G3	pT3c	40,2
ASZ_66	24.01.2014		G3	pT3c	
ASZ_67	29.01.2014		G2		
ASZ_68	03.02.2014		G3	pT3c	
ASZ_69	05.02.2014		G2	pT3c	24,8
ASZ_72	14.03.2014				25,6

7.2 Lebenslauf

7.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiwicz, Baranovski, Bauer, Becker, Brehm, Carl, Cetin, Czubayko, Daut, Dodel, Feuser, Klose, Gress, Grosse; Kann, Kappus, Koolmann, Lill, Lohoff, Maier, Meißner, Moosdorf, Mueller, Müller, Müller-Brüsselbach, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Peterlein, Plant, Printz, Rausch, Reese, Renz, Richter, Rost, Ruchholtz, Seitz, Sekundo; Schmidt, Schüttler, Sekundo, Seifart, Stahl, Steiniger, Strik, Teymoortash, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf u.a.

7.4 Publikation

Reinartz, S., T. Schumann, F. Finkernagel, A. Wortmann, J. M. Jansen, W. Meissner, M. Krause, **A. M. Schwörer**, U. Wagner, S. Müller-Brüsselbach, and R. Müller, Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse: *Int J Cancer*, v. **134**, p. 32-42 (2014)

Teile der Arbeit veröffentlicht in:

Reinartz, S., Finkernagel, F., Adhikary, T., Rohnalter, V., Schumann, T., Schober, Y., Nockher, A.W., Nist, A., Stiewe, T., Jansen, J.M., Wagner, U., Müller-Brüsselbach, S. and Müller, R. A transcriptome-based global map of signaling pathways in the ovarian cancer microenvironment associated with clinical outcome. *Genome Biol.* **17**: 108 (2016)

7.5 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Rolf Müller und Dr. Sabine Müller-Brüsselbach für das in mich gesetzte Vertrauen und die Überlassung dieses abwechslungsreichen Promotionsthemas bedanken. Darüber hinaus bedanke ich mich für die wertvolle Betreuung, konstruktiven Anregungen sowie für das kritische Korrekturlesen des Manuskripts.

Darüber hinaus gilt mein Dank insbesondere meinen Arbeitskollegen im Labor, ohne deren Hilfe ich im „Labor-Dschungel“ verloren gewesen wäre. Hier möchte ich mich insbesondere bei Tim Schumann für die ausdauernde Hilfe bei der Einarbeitung im Labor, sowie bei Julia Obert, Evelyn Schnitzer und Sonja Lieber und Florian Finkernagel für die liebevolle und tatkräftige Unterstützung „ihrer Medizinerin“ bedanken! Für die unterstützende Hilfe bei der Durchführung der ELISAs möchte ich Prof. Dr. Reinartz, Achim Allmeroth und Traute Plaum ganz herzlich danken! Für die Überlassung der klinischen Daten des Patientinnenkollektivs danke ich herzlichst Dr. Marlin Janssen. Ein besonderer Dank geht an PD Dr. Wolfgang Meißner, der mir jederzeit mit wertvollen und unerlässlichen Tipps unter die Arme gegriffen hat.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium ermöglicht haben, sowie bei meinen Freunden für die schöne Zeit in Marburg. Ein riesiges Dankeschön geht insbesondere an Kristina Götz und Patrick Stelmach für das gründliche Korrekturlesen des Manuskripts und die aufbauenden Worte in absolut allen Krisen. Vielen Dank!!

7.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel *„Analyse von Zytokinen im Aszites des Ovarialkarzinoms und Assoziationen mit der klinischen Progression“* im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) unter Leitung von Prof. Dr. Rolf Müller mit Unterstützung durch PD Dr. Sabine Müller-Brüsselbach ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe. Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Vorliegende Arbeit wurde (oder wird) in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht: „International Journal of Cancer (IJC)“ und „Genome Biology“

Ort, Datum, Unterschrift

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen, die Angebote der Philipps-Universität zur Plagiatserkennung (Plagiatssoftware zu beziehen über das Hochschulrechenzentrum) sind mir bekannt.

Ort, Datum, Unterschrift Betreuer